

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**RESPUESTA HUMORAL A LA INFECCION EXPERIMENTAL
POR *Yersinia enterocolitica***

**MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
EN FARMACIA D. ANTONIO JESUS SAMPEDRO
MARTINEZ PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**



ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D. ANTONIO JESUS SAMPEDRO MARTINEZ
LICENCIADO EN FARMACIA por la Universidad de GRANADA
PROGRAMA DE DOCTORADO ECOLOGIA MICROBIANA

DEPARTAMENTO RESPONSABLE MICROBIOLOGIA

TITULO DE LA TESIS "RESPUESTA HUMORAL A LA INFECCION EXPERIMENTAL POR YERSINIA ENTEROCOLITICA"

DIRECTOR/ES DR. D. ALFONSO RUIZ-BRAVO LOPEZ
DRA. D^a JIMENEZ VALERA

TUTOR DR. D. ALFONSO RUIZ-BRAVO LOPEZ

TRIBUNAL

PRESIDENTE ALBERTO RAMOS CORMENZANA

VOCALES RAMON DIAZ GARCIA

ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ

JOSE CARLOS PALOMARES FOLIA

SECRETARIO GERARDO BLAZQUEZ DE CIENFUEGOS LOPEZ

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. ANTONIO JESUS SAMPEDRO MARTINEZ éste procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, éste le calificó APTO CUM LAUDE

Granada 30.06.92
El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: Alberto Ramos Cormenzana

Fdo.:

EL VOCAL,

Fdo.:

EL VOCAL,

Fdo.: A. Osuna

EL VOCAL,

Fdo.:

Dr. D. ALFONSO RUIZ-BRAVO LOPEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Dra. D^a. MARIA JIMENEZ VALERA, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta el Licenciado D. Antonio
Jesús Sampedro Martinez, "RESPUESTA HUMORAL A LA INFECCION
EXPERIMENTAL POR *Y. enterocolitica*" se ha realizado bajo
nuestra dirección en condiciones que le hacen acreedor al
Título de Doctor en Farmacia.

Granada 7 Mayo 1992

Fdo. Dr. A. Ruiz-Bravo López

Fdo. Dr. D^a. M. Jimenez Valera

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.1. HISTORIA. SITUACION TAXONOMICA	2
I.2. MORFOLOGIA. CARACTERISTICAS CULTURALES Y BIOQUIMICAS	6
I.3. PATOGENIA	10
3.1. Serogrupos que afectan al hombre	10
3.2. Patogenia en animales	12
3.3. Patogenia en el hombre	14
3.3.1. Afecciones sépticas	17
3.3.2. Afecciones asépticas. Secuelas	19
3.3.3. Diagnóstico	22
3.3.4. Tratamiento	27
I.4. PLASMIDO DE VIRULENCIA	28
4.1. Historia	28
4.2. Funciones asociadas al plásmido. Marcadores plasmídicos	32
4.3. Proteínas codificadas por el plásmido	43
4.3.1. Internas	43
4.3.2. Externas	45
4.4. Genes plasmídicos. Relación con otros plásmidos de <i>Yersinia</i>	61
I.5. HIERRO Y <i>Yersinia enterocolitica</i>	69
I.6. GENES CROMOSOMICOS Y VIRULENCIA	73
II. OBJETIVOS	76

III. MATERIAL Y METODOS	80
III.1. BACTERIAS	81
III.2. OBTENCION DE EXTRATOS PROTEICOS	81
2.1. Medios de cultivo	81
2.2. Condiciones de cultivo	83
2.3. Extracto proteico de envueltas totales	85
2.4. Extracto enriquecido en OMPs	87
2.4.1. Tratamiento con Sarkosyl	88
2.4.2. Tratamiento con Tritón X-100	89
2.5. Antígeno autoclavado y antígeno formolado	90
2.5.1. Obtención de antígeno autoclavado	90
2.5.2. Obtención de antígeno formolado	90
2.6. Determinación de la concentración proteica	91
III.3. SUEROS	92
3.1. Animales	92
3.2. Sueros anti <i>Yersinia enterocolitica</i>	93
3.3. Suero control positivo para cultivo de células de médula ósea	95
3.4. Sangria, separación y conservación de los sueros	96
III.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	96
4.1. Descripción de la técnica	96
4.2. Tinción de proteínas en geles	103
4.2.1. Tinción con Azul Brillante G	103
4.2.2. Tinción de álcali-plata	104

4.3. Conservación de geles	105
III.5. INMUNOBLOTTING	106
5.1. Descripción de la técnica	106
5.2. Tinción de proteínas en papel de nitrocelulosa	108
III.6. INMUNODETECCION	108
III.7. ESTIMACION DE PESOS MOLECULARES	110
III.8. CULTIVO DE PRECURSORES DE MACROFAGOS-GRANULOCITOS	110
8.1. Medio de cultivo para células de médula ósea	111
8.2. Obtención de células de médula ósea	113
8.3. Cultivo de células de médula ósea	113
III.9. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES	114
9.1. Obtención de inmunocomplejos circulantes	114
9.2. Detección de proteínas integrantes de inmunocomplejos	115
IV. RESULTADOS	117
IV.1. ANALISIS DE EXTRACTOS PROTEICOS POR SDS-PAGE	118
1.1. Proteínas totales de envueltas	118
1.2. OMPs	123
1.2.1. Influencia del tratamiento	123
1.2.2. Influencia del medio de cultivo	127
1.2.3. Análisis de OMPs reveladas por tinción de álicali-plata	135
1.2.4. Influencia de la delipidación por el método de Galanos	139
IV.2. INMUNOBLOTTING	142

2.1. Sueros obtenidos por inmunización intraperitoneal	142
2.1.1. Suero anti IP383 adsorbido con IP383p- y enfrentado a proteínas totales	142
2.1.2. Suero anti IP383 enfrentado a OMPs	145
2.2. Sueros de animales infectados por vía oral	150
2.2.1. Evolución de la respuesta de IgM frente a OMPs	150
2.2.2. Evolución de la respuesta de IgG frente a OMPs	157
2.2.3. Evolución de la respuesta de IgA frente a OMPs	163
2.3. Reacciones cruzadas con OMPs de otros serogrupos	164
IV.3. INMUNOCOMPLEJOS EN SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS ORALMENTE	167
IV.4. ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE LA FORMACION DE COLONIAS POR CELULAS DE MEDULA OSEA EN EL SUERO DE ANIMALES INFECTADOS ORALMENTE	171
V. DISCUSION	174
VI. CONCLUSIONES	200
VII. BIBLIOGRAFIA	204

INTRODUCCION

Yersinia enterocolitica

I.1.-HISTORIA. SITUACION TAXONOMICA.

La posición taxonómica y nomenclatura de esta bacteria ha experimentado diversos cambios desde que se hicieron las primeras alusiones sobre ella. La primera descripción sobre este microorganismo corresponde a SCHLEIFSTEIN y COLEMAN, quienes en 1939 le denominaron *Bacterium enterocoliticum*, basandose en el cuadro gastrointestinal del que era productor. Estos autores consideraban que poseía suficientes propiedades específicas como para crear una nueva especie. En años posteriores esta bacteria tomaría distintas denominaciones asignadas por diversos autores, así HASSIG et al. en 1949 la denominaron *Pasteurella pseudotuberculosis rodentium*; DICKINSON y MOCQUOLT, en 1961

como *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo b; DANIELS y GOODZWAAR, en 1963, como *Pasteurella X*; MOLLARET y DESTOMBES le asignaron en 1964 la denominación de *Germen X*. Su inclusión como especie dentro del género *Yersinia* y con la actual denominación de *Yersinia enterocolitica*, bien diferenciada de la especie *Yersinia pseudotuberculosis*, fué propuesta en 1964 por FREDERICKSEN. Este nombre quedaría definitivamente establecido en 1974, año en el que se incluye en la octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (MOLLARET y THAL, 1974).

Pronto aparecieron cepas de *Y. enterocolitica* con unas características muy peculiares a las que provisionalmente se les asignó el nombre de *Y. enterocolitica "like"*, y su estudio condujo a la caracterización de tres nuevas especies: *Y. intermedia* (BRENNER et al., 1980), *Y. fredericksenii* (URSING et al., 1980) y *Y. Kristensenii* (BERCOVIER et al., 1980). El habitat de estas especies de escaso poder patógeno parece ser el agua para las dos primeras y el suelo para la tercera; sus propiedades bioquímicas son mas dependientes de la temperatura que en el caso de *Y. enterocolitica*, siendo también más sensibles a las sales biliares y creciendo en el medio Salmonella-Shigella sólo por debajo de 30°C (BRENNER et al., 1980; URSING et al.,

1980; BERCOVIER et al., 1980). Posteriormente, se han caracterizado otras nuevas especies: *Y. aldovae*, aislada de ecosistemas acuáticos (BERCOVIER et al., 1984); *Y. rodhei*, aislada a partir de aguas y muestras de heces de perros (ALEKSIC et al., 1987); *Y. mollaretii* y *Y. bercovieri* propuestas por WAUTERS et al. (1988) como dos nuevas especies que antes constituían los biogrupos 3 A y 3 B de *Y. enterocolitica*. La diferenciación de estas nuevas especies con respecto a *Y. enterocolitica* puede realizarse por medio de pruebas de fermentación de azúcares, como queda reflejado en la tabla 1 (FARMER y KELLY, 1991).

Tabla 1. Diferenciación dentro del grupo de *Y. enterocolitica*

	Fermentación de					
	Sacarosa	Rafinosa	L-Rhamnosa	Celobiosa	metil-D-Glucosa	Melobiosa
<i>Y. enterocolitica</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Y. kristensenii</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Y. aldovae</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Y. rohdei</i>	+	+	-	+	-	+
<i>Y. mollaretii</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Y. bercovieri</i>	+	-	-	+	-	-

I.2.-MORFOLOGIA, CARACTERISTICAS CULTURALES Y BIOQUIMICAS

Y. enterocolitica es un pequeño bacilo Gram negativo, no esporulado, no capsulado, perteneciente a la familia ENTEROBACTERIACEAE. Suele presentarse con morfología de cocobacilos cortos en cultivos jóvenes incubados a 30°C o bien con una clara tendencia pleomórfica en cultivos viejos sobre todo incubados a 37°C o cuando ha crecido en medios selectivos como agar Salmonella-Shigella o Desoxicolato (NILEHN 1969^a). Su tamaño oscila entre 1 a 2 µm de largo por 0.5 µm de ancho (NILEHN, 1969^a). Presenta una clara tinción bipolar, más fácilmente observable por medio de una tinción sencilla con azul de metileno o mediante una tinción con Giemsa.

Esta bacteria presenta cambios en su comportamiento metabólico y fisiológico en función de la temperatura de crecimiento, así es móvil por flagelos peritricos a 22°C, cualidad que se pierde por crecimiento a 37°C (BOTTONE, 1977), habiendose detectado la perdida de antígenos flagelares a temperaturas superiores a 30°C (WAUTERS et al. 1971). En cuanto a sus requerimientos nutricionales, en líneas generales, este

microorganismo presenta una mayor actividad metabólica y una menor exigencia nutricional a temperaturas inferiores a 30°C (BOTTONE, 1977). Tiene mayores requerimientos en aminoácidos y vitaminas a 37°C, encontrándose así mismo una relación entre poder patógeno y necesidades aminoacídicas (LEYVA, 1982). En medios líquidos la fase exponencial y fase de deceleración son más precoces y acentuadas a 37°C de forma que en las 15 primeras horas el crecimiento es ligeramente superior a 37°C que a 22°C, mientras que a partir de las 36 o 48 horas de incubación los cultivos contienen siempre un mayor número de bacterias a 22°C que a 37°C (WAUTERS, 1970). En lo referente a medios sólidos, *Y. enterocolitica* crece bien en medios de cultivo ordinarios, no necesitando nutrientes especiales, aunque se desarrolla mejor en agar sangre. Es una bacteria no hemolítica que tolera una amplia gama de temperaturas (4°C a 41°C) pudiendo cultivarse tanto en aerobiosis como anaerobiosis. Su aislamiento se puede efectuar en medios típicos para enterobacterias como Desoxicolato, agar Salmonela-Shigella (S-S), creciendo bien en estos medios a 37°C y 22°C cepas aisladas del hombre, mientras que las de origen animal sólo crecen en estos medios a 22°C. La aparición de colonias R es relativamente frecuente sobre todo cuando se cultivan en estos medios selectivos a 37°C.

(NILEHN, 1969^b). Se ha diseñado un medio especialmente adecuado para este fin, el agar de CIN en el que se emplean como agentes selectivos cefsulodina, irgasan, novobiocina, sales biliares y cristal violeta (SCHIEMANN, 1979). Una característica a resaltar de este microorganismo y que lo diferencia del resto de la misma familia, es su capacidad para crecer a 4°C (BRUNING, 1975), lo que permitiría usar esta temperatura para el enriquecimiento previo a partir de muestras clínicas.

Y. enterocolitica posee las propiedades generales de la familia ENTEROBACTERIACEAE: bacilo anaerobio facultativo, oxidasa negativo, catalasa positivo y que utiliza la glucosa por vía fermentativa produciendo ácidos pero sin producción de gases. Es capaz de reducir los nitratos a nitritos y de hidrolizar la urea siendo más intensa esta hidrólisis a 37°C, mientras que la producción de acetoina (NILEHN, 1969^a) y producción de beta-lactamasas (KOUWATLI et al., 1979) se detectan fácilmente a 25°C, pero su presencia es nula o escasa a 37°C. Otras propiedades bioquímicas importantes para su caracterización y diferenciación del resto de especies de la misma familia son la presencia de ornitina descarboxilasa y ausencia de fenilalanina desaminasa (RAMOS

CORMENZANA, 1979).

I.3.-PATOGENIA

3.1.-SEROGRUPOS QUE AFECTAN AL HOMBRE

Los trabajos realizados por WINBLAND (1967) sobre antígenos somáticos permitieron establecer 9 serogrupos, que serían ampliados a 34 tras los estudios serológicos de estos antígenos llevados a cabo por WAUTERS et al. (1971, 1972). También se ha encontrado en esta bacteria el antígeno común de enterobacterias (LE MINOR et al., 1972) y hasta 20 antígenos flagelares distintos (WAUTERS et al., 1971).

La importancia del tipaje serológico reside en la relación existente entre los serogrupos con la patogenia y su distribución geográfica. Así los serogrupos O:3, O:8, O:5,27 y O:9 son los que mas frecuentemente afectan al hombre, estando el serogrupo O:8 restringido geográficamente a aislamientos clínicos en Norteamérica, mientras que en Europa los porcentajes de aislamientos más elevados corresponden a cepas de los serogrupos O:3 y O:9. No obstante estudios más recientes llevados a cabo por SHAYEGANI et al. (1981) y BOTTONE et al. (1983), han puesto de manifiesto un notable incremento en los aislamientos correspondientes al serogrupo O:3 en New York que comenzó en 1978 y 1979. Los estudios epidemiológicos realizados por BISSETT et al. (1990) en el estado de California han

puesto de relieve que los aislamientos más frecuentes a partir de 1984 correspondieron al serogrupo 0:3 seguido del 0:5,27, mientras que su aparición era rara antes de 1981. Ocasionalmente se han descrito aislamientos del serogrupo 0:8 en Europa, concretamente en España (DIAZ et al., 1991)

NICOLLE et al. en 1976 encuentran una estrecha relación entre biotipia y serctipia con lisotipia, de modo que proponen ésta como un marcador epidemiológico adicional a los dos anteriores. Así, las cepas del serogrupo 0:3 pertenecen al biotipo 4 y su fagotipia corresponde a VIII para cepas europeas, IX para africanas y IXb para las de Canadá, mientras que las cepas del serogrupo 0:9, que pertenecen al biotipo 2, tienen como fagotipo el X3.

Los recientes avances en tecnología genética han aportado buenos métodos de tipaje, basados en la caracterización del genotipo (sondas RNA o DNA, patrones de restricción); en este sentido el análisis del cromosoma y plásmido de virulencia en *Y. enterocolitica* mediante el empleo de endonucleasas de restricción constituyen una buena alternativa a los métodos convencionales de tipaje (KAPPERUD et al., 1990).

3.2.-PATOGENIA EN ANIMALES

Las yersiniosis son zoonosis que pueden transmitirse al hombre. *Y. enterocolitica* parece muy difundida en la naturaleza, pues además de los aislamientos humanos, se ha encontrado en una multitud de animales tanto domésticos como salvajes; sin embargo cada serogrupo tiene un hospedador predilecto, por lo que en pocos casos se ha visto una implicación en epidemiología humana. Así, los serogrupos encontrados en chinchillas y liebres no pertenecen a aquellos que son patógenos para el hombre (WINBLAD, 1973^a). Se han conseguido así mismo aislamientos en porcentajes significativos a partir de perros y gatos (YANAGAWA et al., 1978), a veces responsables de la transmisión al hombre (WILSON et al., 1976), roedores (KAPPERUD, 1975), vacas, caballos y ovejas (WOOLEY et al., 1980), pájaros y ciervos (HUBBERT, 1972), peces y zorros (KAPPERUD, 1981). Pero en la mayoría de los casos las cepas aisladas no guardan relación con la epidemiología humana, al tratarse de cepas pertenecientes a serogrupos no patógenos para el hombre.

Las manifestaciones clínicas que aparecen en el curso de la infección por *Y. enterocolitica* son similares a las producidas por *Y.*

pseudotuberculosis. Los animales aquejados de esta enfermedad muestran apatía, anorexia y diarrea que puede ser sanguinolenta. La muerte sobreviene a las 2 o 3 semanas observándose en la auptosia microabcesos en hígado, bazo y enteritis asociadas o no con adenopatías mesentéricas e incluso a veces pulmonares. Otras localizaciones (oculares, óseas, etc.) son menos frecuentes.

Es el cerdo la especie animal considerada como reservorio principal de aquellos serogrupos que afectan al hombre (AHVONEN et al., 1973; WAUTERS, 1979) y por tanto con una clara implicación en epidemiología humana. La frecuencia de aislamiento y características de la cepa aislada depende del origen de la muestra, así, es más frecuente el aislamiento de muestras de amígdalas y lengua que de heces, y mientras en las primeras muestras las cepas aisladas son preferentemente de serogrupo O:3 en países europeos, en muestras de heces junto con cepas de este serogrupo también se aislan cepas con características idénticas a las aisladas en peces, roedores y medio ambiente. Esto hace pensar que el cerdo es un portador asintomático de *Y. enterocolitica*, a la que podía considerarse un habitante normal de su cavidad oral, por lo que este animal debe jugar un importante papel en la epidemiología de la

infecciones en la especie humana (PEDERSEN, 1979; WAUTERS, 1979). Estudios genéticos mediante en el empleo de endonucleasas de restricción evidencian una gran similitud en los patrones de restricción cromosómicos y plasmídicos de especies aisladas del hombre y el cerdo lo que habla a favor de la importancia del cerdo en las infecciones en el hombre por *Y. enterocolitica* (NESBAKKEN et al., 1987; KAPPERUD et al., 1990).

3.3.-PATOGENIA EN EL HOMBRE

La importancia de las manifestaciones digestivas y de la diarrea en particular, juntos con el hecho de haberse aislado esta bacteria de distintas zonas del tracto digestivo, asociada a otras bacterias enteropatógenas indicaría que la vía de contaminación habitual es la oral. Si bien la transmisión de persona a persona por un mecanismo directo no parece posible, si lo es por un mecanismo indirecto (fecal-oral).

El hombre podría infectarse por el consumo de aguas contaminadas (LASSEN, 1972), sin embargo las cepas de *Y. enterocolitica* más frecuentemente aisladas de este ecosistema son

bioquímicamente atípicas y no pertenecientes a serogrupos patógenos para el hombre. Otra fuente de contaminación serían los alimentos contaminados, contaminación que puede tener su origen en manipuladores, animales o aguas contaminadas. Se ha conseguido el aislamiento de *Y. enterocolitica* de todo tipo de alimentos como leche y sus derivados, productos derivados de huevos, carnes crudas (vaca, cordero y cerdo), vegetales (MOLLARET et al., 1979; LEE, 1977). A veces se ha demostrado la implicación de las cepas aisladas en estos alimentos en enfermedades humanas; no obstante en la mayoría de los casos las cepas aisladas son no serotipables y resultan atípicas desde el punto de vista bioquímico.

Las yersiniosis son más frecuentes en los países de climas fríos. De este modo, en los países escandinavos constituyen una de las enfermedades infecciosas más frecuentes lo que podría explicarse por la capacidad que tiene este microorganismo para crecer a temperaturas bajas (BRUNING, 1975) lo que le permitiría desplazar a otras bacterias incapaces de crecer a esta temperatura. Esta característica de crecimiento de la bacteria permite así mismo comprender el que la yersiniosis sea una infección sujeta a cambios estacionales apareciendo preferentemente en los meses de otoño e

invierno (VANDEPITTE et al., 1973).

Y. pseudotuberculosis es muy similar a *Y. enterocolitica* en lo que respecta a sus caracteres bioquímicos, características de crecimiento, epidemiología, y patogenia. La sintomatología producida por ambas es muy similar, sin embargo algunos aspectos como infección ileo-cecal, ileitis terminal y diarrea (en síndromes entéricos) son exclusivos de *Y. enterocolitica*, mientras que *Y. pseudotuberculosis* se asocia mayoritariamente con adenitis mesentérica y síndromes pseudopendiculares (SWARTZ, 1990).

Y. enterocolitica puede causar en el hombre un buen número de manifestaciones clínicas en relación a la edad, sexo y el estado físico del hospedador, pudiendo hacerse una diferenciación entre afecciones sépticas y aquellas en las que no aparece la bacteria o secuelas asépticas.

3.3.1.-AFECCIONES SEPTICAS

Y. enterocolitica se comporta en el hombre básicamente como enteropatógeno, produciendo cuadros gastroentéricos

(VANDEPITTE y WAUTERS, 1979). Las enterocolitis producidas por *Y. enterocolitica* suelen cursar con dolor abdominal, fiebre, vómitos y diarrea, y las heces en ocasiones son sanguinolentas. El pronóstico es leve, desapareciendo la enfermedad al cabo de una o dos semanas de tratamiento correcto, aunque es posible la aparición de recidivas e incluso cuadros crónicos. La bacteria puede aislarse en las heces de estos enfermos (WINBLAD, 1973^b) apareciendo anticuerpos en la segunda semana de infección con títulos aglutinantes de 1:80 hasta 1:4000 (NILEHN, 1969^a). La presencia de anticuerpos de la clase Ig M indicaría infección reciente, ya que sólo persisten de 1 a 3 meses, mientras que anticuerpos Ig G puede aparecer hasta 14 meses después (GRANFORS, 1979).

Pero esta bacteria también se ha identificado como causante de otros procesos más graves como linfadenitis mesentérica (BRAUNSTEIN et al., 1971), ileitis aguda terminal (BOTTONE, 1977) y síndromes pseudoapendiculares y apendicitis que frecuentemente requieren intervención quirúrgica (NILEHN y SJOSTROM, 1967).

A pesar de que *Y. enterocolitica* es capaz de producir una enterotoxina que se muestra activa en el asa ileal de conejos y en

ratones neonatos (PAI y MORS, 1978) el hecho de que se presente en cepas tanto ambientales como clínicas (KAPPERUD, 1980) y el que se produzca sólo a temperaturas por debajo de 30°C (PAI y MORS, 1978) unido a la demostración por UNE en 1977 y PAI et al. en 1980 utilizando conejos como modelo experimental, de que la bacteria penetra en la lámina propia intestinal, ha llevado a encuadrar esta bacteria dentro de aquellos enteropatógenos del ser humano que actúan por un mecanismo invasivo, atravesando la lámina propia intestinal y alcanzando los ganglios linfáticos mesentéricos, no sobrepasando este nivel en individuos no inmunocomprometidos (LEVINE et al., 1983). Otros autores han indicado la posibilidad de que este microorganismo, en determinados individuos, alcance la circulación general llegando a originar cuadros sépticos y manifestaciones extraintestinales (lesiones supurativas y nodulares en hígado, lesiones supuradas en pulmón y meninges etc.). Tales individuos serían inmunocomprometidos o de avanzada edad (WINBLAD, 1973^b), individuos cirróticos (BOUZA et al., 1980) afectados de talasemia (BUTZLER et al., 1978) o individuos con sobrecarga plasmática de hierro (hemosiderosis) (RABSON et al., 1975; ROBINS-BROWNE et al., 1979).

RABSON et al. (1975) distinguen una forma de septicemia aguda con trastornos gastrointestinales y otra forma subaguda con trastornos en la zona del hipocondrio derecho sin manifestaciones gastrointestinales y de peor pronóstico que la primera.

3.3.2.-AFECCIONES ASEPTICAS. SECUELAS

La principal secuela originada por la yersiniosis es la artritis aséptica, no purulenta, similar a la fiebre reumática (WINBLAD, 1973^b; WINBLAD, 1975), apareciendo en estos individuos una persistencia anormalmente elevada en los títulos de Ig A subsiguiente a la infección por esta bacteria (GRANFORS, 1979). Suele presentarse en individuos adultos y generalmente asociada a presencia del antígeno de histocompatibilidad HLA B-27 (AHO et al., 1974; GRANFORS et al., 1980). En individuos con igual haplotipo se ha relacionado con la aparición del síndrome de Reiter caracterizado por la aparición de artritis junto a uveitis y conjuntivitis (DAUSSET, 1981). Se ha descrito también como secuela de la yersiniosis el síndrome de Sjögren (LARSON, 1979), enfermedad de naturaleza autoinmune que se caracteriza por sequedad de boca (xerostomía) y de ojos (queratoconjuntivitis) consecuencia de la destrucción,

mediada inmunológicamente, de glándulas lacrimales y salivares y en muchos casos asociada a otras enfermedades autoinmunes, generalmente artritis reumatoide. En individuos afectados por este síndrome, mayoritariamente mujeres de mediana edad, se ha demostrado la existencia de autoanticuerpos frente a conductos salivares y tiroides (ROITT, 1984), señalando a este respecto la existencia de una relación antigénica entre *Y. enterocolitica* y la membrana de las células tiroideas (LIDMAN et al., 1974). Otra secuela aséptica tempranamente reconocida fué el eritema nodular (WINBLAD, 1966). La frecuencia corta de la sintomatología gastrointestinal precedente así como la duración relativamente corta lo diferencia con el de otras etiologías.

WINBLAD (1973^b) establece una relación entre la edad del individuo infectado con el síndrome originado por esta bacteria, de modo que hasta los 20 años predominarían los síndromes gastrointestinales y linfadenitis mesentérica; en el individuo adulto (20 - 60 años) se producirían preferentemente disturbios abdominales agudos, diarreas y artritis; mientras que en personas mayores de 60 años la manifestación predominante sería el eritema nodular.

LARSON (1979), ha propuesto tres estadios en lo referente a las manifestaciones clínicas:

- Fase primaria o aguda que aparecería en los primeros días de la infección y donde las principales manifestaciones serían enteritis, linfadenitis mesentérica, apendicitis, ileitis aguda terminal, tonsilitis, neumonía, septicemia, erisipela y abscesos.

- Fase secundaria o de complicación donde aparecerían desórdenes inflamatorios en piel, astralgias, mono y poliartritis, artritis reumatoide aguda y más raramente uveitis, pericarditis y obstrucciones vasculares.

- Fase terciaria o recurrente donde encontraríamos la artritis reumatoide, dermatitis inflamatoria, lesiones arteriales y musculares y enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren.

3.3.3.-DIAGNOSTICO

El diagnóstico de yersiniosis está basado en el aislamiento de la bacteria y la serología.

El aislamiento a partir de tejidos normalmente

estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo, triturado de gánglios mesentéricos...) no ofrece mayor dificultad, pues la bacteria crece bien en agar sangre y en medios selectivos; sin embargo el aislamiento a partir de heces presenta mayores problemas por la flora intestinal acompañante. El enriquecimiento previo de la muestra por incubación a 4°C no es un procedimiento práctico, pues alarga mucho el tiempo de aislamiento e identificación además de producir una selección de cepas no patógenas y de otras yersinias. El medio más recomendado para el aislamiento de *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras de heces es el agar de CIN, incubando durante 24 horas a 37°C o a 22°C durante 48 horas, apareciendo a las 18 - 24 horas colonias translúcidas pudiendo verse a veces el centro de la misma un color rojo oscuro. Puede introducirse también en la rutina de laboratorio agar Mac Conkey, incubando a 37°C 24 horas apareciendo colonias más pequeñas que en el caso de otras enterobacterias, y usualmente lactosa negativas aunque pueden aparecer cepas lactosa positivas. El empleo de otros medios selectivos como el Hektoen y agar Salmonella-Shigella no es adecuado pues el crecimiento de muchos serogrupos puede inhibirse en estos medios (FARMER y KELLY, 1991).

Identificación y diferenciación de serogrupos patógenos y cepas virulentas:

Para la identificación del microorganismo, una vez aislado puede realizarse por medio de un screening bioquímico en el que se incluirá un TSI y actividad ureasa, así como observación de la movilidad a 37°C y 22°C (FARMER y KELLY, 1991).

Para confirmar el que la cepa de *Y. enterocolitica* es la causante del proceso infeccioso, es necesario demostrar su pertenencia a un serogrupo patógeno así como detectar la presencia del plásmido de virulencia. Para diferenciar los serogrupos patógenos de aquellos que no lo son existen diversos test como son: test de la pirazinamidasa negativo en aquellos serogrupos patógenos (KANDOLO y WAUTERS, 1985); y negatividad en la hidrólisis de la esculina y fermentación de la salicilina en aquellos patógenos (SCHIEMANN et al., 1981; TOMA et al., 1984). En la tabla 2 quedan reflejados los resultados de estos test.

Para la detección del plásmido de virulencia existen diversos procedimientos basados todos ellos en detectar marcadores

asociados al mismo, de los que se hablara más ampliamente en el capítulo siguiente. Sólo cabe mencionar aquí que el uso de medios sólidos adicionados de oxalato magnésico y rojo congo, permiten detectar simultáneamente 2 marcadores plásmidicos como son el requerimiento de calcio para crecer a 37°C y la incorporación del colorante anterior por las colonias portadoras del plásmido crecidas a 37°C (RILEY y TOMA, 1989).

El diagnóstico serológico puede realizarse por medio de una aglutinación empleando como antígeno cepas de los serogrupos 0:9, 0:3 y 0:8 (serogrupos patógenos más frecuentes) crecidas a 26°C y posteriormente autoclavadas; títulos mayores a 1280 indicarían enfermedad aguda, teniendo ya valor diagnóstico títulos superiores a 160 (FOWLER y BRUBAKER, 1986). Pueden utilizarse también técnicas de radioinmunoensayo e inmunoensayo, que permiten detectar títulos de anticuerpos de clases IgG, IgA e IgM; La presencia de títulos de IgM indicaría infección reciente, persistiendo de 1 a 3 meses, mientras que anticuerpos de clase IgG pueden persistir hasta 14 meses después de haberse adquirido la infección (GRANFORS, 1979). Ha de tenerse en cuenta la posibilidad de reacciones cruzadas entre el serogrupo 0:9 y *Brucella* (BUNDLE et al., 1984), así como la

INTRODUCCION

aparición de títulos anormalmente elevados frente a *Yersinia enterocolitica* en individuos afectados de tiroiditis autoinmune (BECH et al., 1977).

Tabla 2. Test para identificación de serogrupos patógenos en *Y. enterocolitica*

test	Reaccion		
	<i>Y. enterocolitica</i>		Otras especies en el grupo de <i>Y. enterocolitica</i>
	Serogrupos patógenos	Serogrupos no patógenos	
Pyrazinamidasa	-	+	+
Fermentación salicina	-	+	+
Hidrólisis esculina	-	+	+

3.3.4.-TRATAMIENTO

En 1982 la O.M.S. recomendaba la asociación de trimetoprim-sulfametoxazol para las formas de yersiniosis no complicadas, mientras que para las formas graves se recomendaba el empleo de tetraciclinas (excepto en niños) aminoglicosidos y cloranfenicol, no necesitando el empleo de antibióticos la formas entéricas, en los que sólo se debe emplear tratamiento sintomático. KWAGA e IVERSEN (1990) encuentran que las cepas de *Y. enterocolitica* aisladas del cerdo y productos derivados del mismo son muy sensibles a algunas cefalosporinas (ceftriaxona, ceftazidima y cefotaxima), imipenen, ticarcilina asociada a clavulánico, aztreonam, fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol, recomendando estos para prevención de zoonosis; así mismo observan la aparición de resistencias frente a nuevas penicilinas (ticarcilina, mezlocilina), no encontradas anteriormente por HORSTEIN et al. (1985).

I.4.-PLASMIDO DE VIRULENCIA

4.1.-HISTORIA

A partir de 1980 se produce un cambio sustancial sobre el conocimiento de los factores de virulencia en *Yersinia*, año en el que aparecen dos trabajos que confirman la existencia de un plásmido asociado a la virulencia de *Y. enterocolitica* (ZINK et al., 1980; GEMSKI et al., 1980^a), plásmido cuya presencia habia sido sugerida dos años antes por ZINK et al. (1978); las primeras observaciones de ZINK et al. (1978, 1980) se referían a la asociación entre la invasividad "in vivo", revelada por la producción de conjuntivitis en cobayas, y la presencia de un plásmido. En el trabajo de GEMSKI et al. (1980^a) se asocia no sólo con la invasividad "in vivo", sino también con la letalidad para ratones infectados peritoneal u oralmente (hay que mencionar aquí que el estudio se realizó con cepas del serogrupo 0:8, altamente virulentas para el ratón) y con la dependencia de calcio para crecer a 37°C. El conocimiento de la presencia de un plásmido asociado a la virulencia y al requerimiento de calcio para crecer a 37°C se extendió rápidamente a otras especies del mismo género como *Y. pseudotuberculosis* (GEMSKI et

al., 1980^b) y *Y. pestis* (FERBER y BRUBAKER, 1981; PORTNOY y FALKOW, 1981); sin embargo su presencia no es segura en *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* y *Y. kristensenii* (PRPIC et al., 1985) y tampoco se ha detectado su presencia en *Y. mollaretii* y *Y. bercovieri* (WAUTERS et al., 1988) y *Y. rohdei* (ALEKSIC et al., 1987).

La caracterización física y determinación del peso molecular de este plásmido de virulencia se consiguió por medio de electroforesis en geles de agarosa, encontrándose ligeras diferencias en su peso molecular entre unos serogrupos y otros; así PORTNOY et al. (1981) detectan el plásmido de virulencia en cepas de los serogrupos 0:Tacoma, 0:8, 0:18, 0:20 y 0:1 asignándoles un peso molecular (determinado a través de sus movilidades relativas en geles de agarosa) de 48 Mdal al primero de ellos y 40 a los demás. Al igual que estos autores otros investigadores como VESIKARI et al. (1981) caracterizan físicamente el plásmido en los serogrupos 0:8, 0:9 y 0:3 asignándole un peso molecular de 42 Mdal, 44 Mdal y 47 Mdal respectivamente; AULISIO et al. (1983) calculan su peso molecular en 42 Mdal en cepas de los serogrupos 0:4,32, 0:13,7, 0:21, 0:8 y 0:9 y de 44 o 42 Mdal en el serogrupo 0:3; también es caracterizado físicamente en cepas pertenecientes a serogrupos 0:2 y 0:5, aisladas

a partir de animales con yersiniosis, con pesos moleculares de 43 a 58 Mdal en el serogrupo 0:2 y de 41 Mdal en el 0:5 (KAPPERUD et al., 1985^b).

Pronto irían apareciendo complicaciones a estos primeros descubrimientos, así WACHSMUTH et al. (1984) y PRPIC et al. (1985) encuentran cepas que poseen un plásmido con un tamaño similar al de virulencia y asociado a algunos marcadores plasmídicos, pero que carecen de virulencia en ratones con sobrecarga oral de hierro como tratamiento facilitador de la infección. Otra complicación aparece cuando KAY et al. (1982) describen la presencia de un plásmido de 82 Mdal junto con el típico de virulencia y a veces en solitario en cepas virulentas de *Y. enterocolitica*, pero este nuevo plásmido sería considerado como un dímero del plásmido de virulencia presente en dichas cepas (WACHSMUTH et al., 1984).

Aunque la presencia del plásmido de virulencia es un requisito indispensable para que *Y. enterocolitica* sea virulenta, no es condición suficiente ya que también se requieren genes cromosómicos. De hecho la transferencia del plásmido de virulencia a cepas que carecen de dichos genes (cepas "ambientales"

INTRODUCCION

pertenecientes a serogrupos no patógenos) no las convierte en virulentas (HEESEMAN et al., 1984).

4.2.-FUNCIONES ASOCIADAS AL PLASMIDO. MARCADORES PLASMIDICOS

Simultaneamente al hallazgo del plásmido de virulencia en *Y. enterocolitica*, aparecen trabajos que tienen por objeto detectar marcadores seguros y fáciles de determinar asociados al mismo, establecer su significación y conocer los mecanismos de virulencia asociados a él.

LAIRD y CAVANOUGH (1980) encontraron que las cepas virulentas para ratones presentaban el fenómeno de autoaglutinación (formación de flóculos o agregados) cuando crecían a 37°C en medios líquidos de cultivo de células animales, mientras que esta característica no se manifestaba en cepas avirulentas que crecían en suspensión dispersas y homogéneas, fenómeno que no era nuevo pues era conocido en *Y. pseudotuberculosis* (BRUBAKER, 1967). Investigaciones posteriores establecieron ya una correlación entre autoaglutinación a 37°C en medios de cultivo de células animales y presencia del plásmido de virulencia asociada al requerimiento de calcio para crecer a esta temperatura (VESIKARI et al., 1981; PAI y DE STEPHANO, 1982; SCHIEMANN y DEVENISH, 1982; AULISIO et al., 1983). Así mismo, KAPPERUD y LASSEN (1983) encuentran una estrecha

relación entre la presencia del plásmido de virulencia y la capacidad de esta bacteria crecida a 37°C para aglutinar hematíes de cobaya, hemaglutinación resistente a la presencia de manosa (MRHA). La dependencia de calcio que presentan las cepas portadoras del plásmido de virulencia para crecer a 37°C es un marcador útil que permite diferenciarlas de las no portadoras del plásmido de virulencia; también permite la obtención de derivados isogénicos sin plásmido a partir de una cepa con plásmido, pues las colonias que crezcan a 37°C en un medio limitado en calcio, como es el medio MOX (HIGUCHI y SMITH, 1961), a partir de la siembra de una cepa virulenta, representan clones que han perdido espontáneamente el plásmido. No tardarían, sin embargo en aparecer trabajos críticos que hacían entrever una mayor complejidad, así PERRY y BRUBAKER (1983) encuentran cepas que manifiestan el fenómeno de la autoaglutinación como una propiedad constitutiva, lo que disminuiría su valor como marcador plasmídico, si bien en estos casos el fenómeno no guardaba relación con la temperatura de crecimiento; aparecen también cepas que no presentaban el fenómeno de autoaglutinación pero que manifestaban su dependencia de calcio para crecer a 37°C, y cepas autoaglutinables que no lo requieren y en ambos casos dan positivos algunos de los ensayos de virulencia

realizados (KAY et al., 1983).

Uno de los principales factores determinantes de virulencia en *Y. pestis* es la capacidad de producir antígenos V y W (fenotipo VWa⁺) (BURROWS y BACON, 1956). En el caso de *Y. enterocolitica*, un primer estudio con cepas altamente virulentas del serogrupo 0:8 permitió detectar la producción de ambos antígenos en bacterias crecidas a 37°C en condiciones limitantes en calcio; el hecho de que se pudiesen obtener con relativa frecuencia mutantes incapaces de producir estos antígenos y que además no presentaran dependencia de calcio para crecer a 37°C hizo pensar que su producción estaba mediada por un plásmido y no por el cromosoma, y muy posiblemente el plásmido descrito por entonces por GEMSKI et al. (1980^a). Posteriormente PERRY y BRUBAKER (1983) definían el fenotipo VWa⁺ en *Y. enterocolitica*, mediado por un plásmido de 41 a 48 Mdal y caracterizado por el requerimiento de calcio para crecer a 37°C; la expresión del antígeno W a 37°C en ausencia de calcio (reprimible por adición de calcio en la mayoría de las cepas); la autoaglutinación a 37°C no afectada por la presencia de calcio; y la resistencia al poder bactericida del suero humano fresco, expresada a 37°C y tampoco afectada por el calcio (por lo tanto independiente

de la expresión del antígeno V).

El hecho de que el plásmido no sea autotransmisible por conjugación y las dificultades que plantea la transformación del DNA plasmídico en el género *Yersinia* plantean problemas para el estudio del verdadero papel del plásmido en la virulencia de *Y. enterocolitica*, que se han podido superar mediante distintas aproximaciones. Por una parte, técnicas de DNA recombinante han permitido construir híbridos entre el plásmido y el vector movilizante de amplio espectro pRK 290, que introducidos en receptores de *Y. enterocolitica* portadores del plásmido de virulencia originaron cointegrados de ambos plásmidos; estos cointegrados, no conjugativos, se introdujeron por transformación en *E. coli*, del que se transmitieron con ayuda de un plásmido "helper" de amplio espectro, a cepas avirulentas de *Y. enterocolitica* en las que se restauraron las propiedades de letalidad para el ratón, conjuntivitis en cobayas y dependencia de calcio a 37°C (HEESEMANN y LAUFS, 1983). En trabajos posteriores movilizandó determinadas partes del plásmido, también por cointegración, HEESEMANN et al. (1984) separan dos grupos de caracteres plasmídicos: la virulencia "in vivo", sólo expresada cuando los transconjugantes vienen de

cepas isogénicas sin plásmido derivadas de las cepas donantes; y la dependencia de calcio y autoaglutinación transferibles a diversos receptores no isogénicos con los donantes.

Otros autores centran sus investigaciones en estudiar la interacción de *Y. enterocolitica* con células de mamíferos "in vitro" e "in vivo", así como el establecer el posible papel del plásmido en esta interacción.

Ya en 1977, antes de tenerse conocimiento sobre la existencia del plásmido de virulencia, LEE et al. describen la capacidad que presenta *Y. enterocolitica* para invadir células HeLa, pero no encuentran una relación entre invasividad "in vitro" y virulencia, pues no todas las cepas que se mostraban invasivas eran virulentas para el hombre. No obstante, sí se encuentra una relación entre capacidad de penetración en células HeLa y la inducción de enterocolitis experimental en conejos (UNE, 1977). En cuanto a la relación entre invasividad "in vitro" y la presencia del plásmido de virulencia, los trabajos de SCHIEMANN y DEVENISH (1982) demuestran que la pérdida de este plásmido no afecta a la capacidad infectante en células HeLa, pero encuentran una correlación entre invasividad

y biotipos capaces de fermentar la sacarosa, restringiéndose la invasividad a los serogrupos 0:1, 0:1,2,3, 0:3, 0:5,27, 0:8, 0:9 y 0:21. Tampoco se han encontrado evidencias de que la presencia del plásmido de virulencia influya en la infección de células HEp-2 (línea epitelial humana) por *Y. enterocolitica*, si bien las cepas portadoras del plásmido se manifiestan más tóxicas que las no portadoras, mostrándose esta citotoxicidad por el despegue de las células de la superficie en la que han crecido en monocapa (PORTNOY et al., 1981); de hecho investigaciones más recientes han localizado el fragmento de DNA plasmídico responsable de este efecto citotóxico (MILIOTIS et al., 1990). No sólo la presencia del plásmido de virulencia no parece influir en la invasividad "in vitro", sino que hace que las cepas portadoras sean menos invasivas, considerando el término invasión como internamiento intracelular (VESIKARI et al., 1981). Los trabajos de LASSEN y KAPPERUD en 1986 con cepas de los serogrupos 0:3, 0:9 y 0:8 y su interacción con células HEp-2 ponen en evidencia como la presencia del plásmido de virulencia en cepas de los serogrupos 0:9 y 0:3 se opone a la internamiento de la bacteria (en el 0:3 además se requiere la temperatura de 37°C), mientras que esta resistencia es constitutiva en el serogrupo 0:8. La presencia del plásmido de virulencia, por

tanto, se asociaría con la adherencia o unión a la superficie de células HEp-2, mientras que su ausencia se asociaría a invasividad en los serogrupos patógenos, únicos capaces de interaccionar con células de mamífero "in vitro" (VESIKARI et al., 1983). Estos hechos son de gran importancia si se tiene en cuenta que pueden ser extensibles a otras células, como es el caso de macrófagos, por lo que la presencia del plásmido de virulencia pudiera asociarse a una protección frente a la fagocitosis, al menos en cepas pertenecientes a los serogrupos 0:3 y 0:9 (VESIKARI et al., 1983). En este sentido hablan los trabajos llevados a cabo por LIAN y PAI quienes en 1985, al estudiar la interacción de *Y. enterocolitica* con polimorfos nucleares neutrófilos "in vitro" mediante el empleo de técnicas de quimioluminiscencia, encuentran que la respuesta de quimioluminiscencia para cepas con plásmido a 37°C es menor que para esas mismas cepas a 22°C o bien para cepas sin plásmido a cualquier temperatura. Al extender estos estudios a una situación "in vivo" ha de tenerse en cuenta que difiere de la situación "in vitro", no sólo por la interdependencia entre los mecanismos defensivos humorales y celulares existentes en un organismo vivo, sino también por la influencia que ejerce el medio en la expresión de aquellos factores mediados plasmidicamente (SKURNIK, 1985). En

este sentido los trabajos de LIAN et al. (1987) por medio del empleo de microscopía electrónica, muestran como cepas del serogrupo 0:3 sin plásmido de virulencia inoculadas intradérmicamente en conejos son fagocitadas, mientras que las que poseen este plásmido escapan a la fagocitosis lo que les permite crecer extracelularmente, situación similar a la encontrada por HANSKI et al. (1991) en el serogrupo 0:8 en la cavidad peritoneal en ratones.

El hecho de que la invasividad esté mediada por el cromosoma y el que la inhibición de la fagocitosis lo esté por el plásmido permite explicar el camino que sigue *Y. enterocolitica* en el intestino tras una infección oral. Después de la administración oral de la bacteria, ésta es capaz de penetrar en la lámina propia intestinal siendo fagocitada en esta por PMN y células mononucleares aquellas cepas que no poseen plásmido de virulencia, mientras que la presencia del plásmido protegería a la bacteria de la fagocitosis permitiéndole proliferar extracelularmente, jugando la membrana basal un papel decisivo en la limitación de la entrada de la bacteria (HANSKI et al., 1989).

En cuanto a la vinculación entre presencia del plásmido de

virulencia y la invasividad "in vivo" estudiada a través del test de SERENY (1955), fué puesta de manifiesto junto a las primeras alusiones sobre la existencia de este plásmido en cepas virulentas de *Y. enterocolitica* (GEMSKI et al., 1980^a; ZINK et al., 1980). No existe relación entre la invasividad "in vivo" e "in vitro", así serogrupos que se muestran invasivos en cultivos celulares sin plásmido de virulencia no son capaces de producir conjuntivitis en cobayas (MAKI et al., 1983). La capacidad que presentan *Y. enterocolitica* para producir conjuntivitis en cobayas varia en función del biotipo y serogrupo, así, las cepas portadoras del plásmido pertenecientes al serogrupo 0:8 (biotipo 1) dan el test positivo, pero las de los serogrupos 0:3 y 0:9 se han descrito como negativas (MORS y PAI, 1980), aunque estos serogrupos pueden producir una conjuntivitis moderada a condición de utilizar unos inóculos suficientemente grandes (SCHIEMANN y DEVENISH, 1986). Según AULISIO et al. (1983), sólo las cepas que además de poseer el plásmido sean capaces de producir lipasa (propiedad que define al biotipo 1) dan una clara positividad en el test de Serény.

Por otro lado las cepas portadoras del plásmido de virulencia crecidas a 37°C poseen una mayor resistencia a la acción bactericida

del suero humano fresco, a la cual son sensibles los derivados isogénicos sin plásmido; esta resistencia que es independiente de la presencia de calcio, pudiera jugar un importante papel en la virulencia de *Y. enterocolitica* (PAI y DE STEPHANO, 1982; MARTINEZ, 1983).

Además de la autoaglutinación y dependencia de calcio para crecer a 37°C, otro marcador plasmídico que permite una fácil diferenciación de las cepas portadoras de las no portadoras del plásmido es la diferencia en la morfología colonial a 37°C en medio RPMI 1640 solidificado con agar. Las cepas con plásmido originan microcolonias a las 48 horas, mientras que las cepas sin plásmido forman colonias grandes y de superficie lisa (MAZIGH et al., 1983). Pueden también diferenciarse por medio del ensayo del cristal violeta (BHADURI et al., 1987), basado en la incorporación de este colorante de las cepas portadoras del plásmido crecidas a 37°C, siendo incapaces de incorporarlo cuando han crecido a 25°C o cuando carecen del plásmido a cualquier temperatura, de modo que las primeras a 37°C darán colonias de color violeta oscuro mientras que a 25°C y cepas sin plásmido aparecerán con un tono blanco. Otro test que permite esta diferenciación de un modo rápido es el ensayo del

Rojo Congo, consistente en la incorporación de éste por las cepas portadoras del plásmido después de haber sido sembradas en un medio sólido que contenga el colorante y tras 48 horas de incubación a 25°C, de modo que éstas aparecieran de color violeta y las no portadoras por el contrario de color blanco o rosa (PRPIC et al., 1983; PRPIC et al., 1985).

Asociado al plasmido de virulencia se encuentra la producción de proteínas de membrana externa codificadas por el mismo, así como la secreción de éstas al medio, punto que será tratado en el apartado que se expone a continuación.

4.3.-PROTEINAS CODIFICADAS POR EL PLASMIDO

4.3.1.-INTEKNAS

Los antígenos V y W (designados VWa) fueron identificados inicialmente en extractos de cepas virulentas de *Y. pestis* por BURROWS y BACON (1956), quienes posteriormente los encontraron también en extractos de cepas virulentas de *Y. pseudotuberculosis* (BURROWS y BACON, 1960).

CARTER et al. (1980), utilizando antisueros de conejo frente a *Y. pestis*, demostraron por técnicas de inmunodifusión en gel la presencia del antígeno V (Va) en una cepa virulenta de *Y. enterocolitica* (serogrupo 0:8) y su ausencia en un derivado de la misma carente del plásmido. Al igual que en los casos de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, la síntesis de Va por cepas virulentas de *Y. enterocolitica* ocurre a 37°C en medios limitados en calcio (CARTER et al., 1980; PERRY y BRUBAKER, 1983). En estas condiciones, PERRY y BRUBAKER (1983) detectaron Va en cepas virulentas de *Y. enterocolitica* pertenecientes a los principales serogrupos patógenos (0:3, 0:9, 0:8, 0:4,32, 0:15 y 0:21).

Aunque Va se localiza intracitoplásmicamente, las condiciones que favorecen su producción promueven también su secreción al medio. BOLIN et al. (1988) establecieron en 38 Kdal el peso molecular del Va secretado por las tres especies (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*), usando como representante de *Y. enterocolitica* una cepa virulenta del serogrupo 0:8. Según MICHIELS et al. (1990), Va puede detectarse tanto en fracciones solubles como en sobrenadantes de cultivo de *Y. enterocolitica*, pero su presencia es escasa en la fracción de proteínas de membrana externa. Estos autores dan un peso molecular de 41 Kdal al Va producido por una cepa del serogrupo 0:9, reseñando que la misma proteína ha sido designada también com Yop41.

Según BRUBAKER (1991), se ha considerado generalmente que Va está implicado en los mecanismos de virulencia de las yersinias. En su trabajo ya citado sobre *Y. enterocolitica*, CARTER et al. (1980) especulan sobre el posible papel de Va en la resistencia a los mecanismos bactericidas de los fagocitos. UNE y BRUBAKER (1984) demostraron que la administración intravenosa de Va a ratones infectados por la misma vía con una cepa avirulenta de *Y. enterocolitica* interfirió con la depuración de las yersinias,

promoviendo su supervivencia en pulmones, bazo e hígado. Esta interferencia con la fagocitosis ocurre "in vivo" pero no "in vitro", lo que sugiere que Va ejerce algún tipo de bloqueo sobre la activación de macrófagos por linfocitos.

4.3.2.-EXTERNAS

La membrana externa de Gram negativas constituye la interfase que separa el medio externo del medio interno bacteriano existiendo por tanto entre ésta y el hospedador una importante interacción tanto a nivel de virulencia por parte de la bacteria como a nivel defensivo por parte del organismo hospedador. Diversos autores han centrado sus esfuerzos en el estudio de las moléculas codificadas por el plásmido de virulencia, así como de sus posibles funciones en la virulencia de *Y. enterocolitica*. En 1981 PORTNOY et al., detectan por primera vez la existencia de polipéptidos codificados por el plásmido en extractos antigénicos enriquecidos en proteínas de membrana externa obtenidos a partir de cepas del serogrupo 0:8 crecidas en BHI a 37°C y reprimibles por la presencia de calcio, no apareciendo a 25°C ni en cepas sin plásmido a cualquier temperatura. Estas OMPs (proteínas de membrana externa)

codificadas por el plásmido de virulencia se conocen convencionalmente por algunos autores por el término de Yops (Yersinia Outer Membrane Proteins) y a medida que se les ha ido caracterizando se les ha asignado números y a los genes que las codifican se les ha denominado como *yop* seguida de una letra; sin embargo CORNELIS et al. (1987^a), proponen para la identificación de estos polipéptidos el término de Yops o POMPs (Plasmid Outer Membrane Proteins) seguido de un número igual a su peso molecular en Kdal y para los correspondientes genes el término *yop* seguido del mismo número. Más recientemente en una reunión celebrada en 1990 en la Universidad de California se acordó un cambio en la nomenclatura de la Yop de mayor peso molecular (denominada Yop1 o P1) y que pasa a llamarse YadA (referido por PAERREGAARD et al., 1991^a).

PORTNOY et al. en 1984 detectaron la presencia de cuatro Yops en cepas del serogrupo 0:8 crecidas a 37°C y un año después se amplió a cinco el número de estos polipéptidos (BOLIN et al., 1985). La presencia de Yops ha sido confirmada en otros serogrupos como 0:9 (SKURNIK et al., 1984), 0:2 0:5,27 (KAPPERUD et al., 1985^b), 0:4,32 y 0:21 (CHANG y DOYLE, 1984), aunque no todos coinciden en el número

y peso molecular de estos polipéptidos existiendo variaciones incluso dentro del mismo serogrupo. El número y peso molecular de las Yops varia de unos serogrupos a otros, dependiendo del medio de cultivo utilizado y de los procedimientos de extracción y análisis de las mismas. En la Tabla 3 quedan reflejados los pesos moleculares de las Yops de los distintos serogrupos asignados por diversos autores.

En general, existe poca variación en la asignación de pesos moleculares de Yop5 (24 Kdal - 26 Kdal), Yop4 (35 Kdal - 38 Kdal) y Yop2 (46 Kdal - 52 Kdal) (BOLIN et al., 1985). Sí existe, sin embargo, una mayor discrepancia respecto al peso molecular de Yop1 : en cepas del serogrupo 0:8 se le ha asignado un peso molecular de 180 Kdal (KAPPERUD et al., 1985^b) o de 150 Kdal (PORTNOY et al., 1984; BOLIN et al., 1985) e incluso CHANG y DOYLE (1984) detectan dos con pesos moleculares de 130 y 140 Kdal. En cepas del serogrupo 0:3 y 0:9 Yop1 tiene un peso molecular comprendido entre 200 y 240 Kdal (SKURNIK et al., 1984; CORNELIS et al., 1986; ZALESKA et al., 1985). KAPPERUD et al. (1985^b) detectan esta Yop1 en distintos serogrupos (incluidos el 0:3, 0:8 y 0:9) asignándole un peso molecular de 180 Kdal. Al contrario que ocurre con el resto de Yops, la aparición de esta proteína de elevado peso molecular en la membrana externa no se ve

afectada por la presencia de calcio en el medio (SKURNIK et al. 1984; MARTINEZ, 1983; BOLIN et al. 1985) y es capaz de aparecer en medios mínimos pero siempre a la temperatura de 37°C; para que el resto de Yops aparezcan en la membrana externa de *Y. enterocolitica* es necesario su crecimiento en un medio rico a 37°C y se favorece por la ausencia de calcio (PORTNOY et al., 1984) pero en un medio mínimo a pesar de tener lugar su síntesis no serán insertadas en la membrana externa, por lo que no se detectaran en ésta (BOLIN et al., 1985).

Tabla 3. Pesos moleculares de Yops en Kdal

Serogrupo	Yop1	Yop2	Yop3	Yop4	Yop5	
0:8 (a)	150	46		34	24	
0:8 (b)	150	44	40	36	26	
0:8 (c)	160 140	47		35		
0:8 (f)	180					
0:3 (f)	180					
0:5,27(f)	180					
0:9 (c)	180 160	47		35		
0:9 (g)	140	47		36	25	
0:9 (f)	180					
0:9 (d)	240					
0:9 (e)	210	84,5	51,2	40,8	37,4	25,1

(a). PORTNOY et al., 1984.

(b). BOLIN et al., 1985.

(c). CHANG v DOYLE, 1984.

(d). SKURNIK et al., 1984.

(e). CORNELIS et al., 1987.

(f). KAPPERUD et al., 1985^b.

(g). CHALVIGNAG et al., 1988.

Utilizando envueltas celulares enteras de cepas del serogrupo 0:3 para el análisis de las proteínas dependientes del plásmido de virulencia, por medio de técnicas de Wester blot y el uso de antisueros adsorbidos con cepas avirulentas, SKURNIK (1985) encontraron que la expresión del plásmido de virulencia depende mucho de la temperatura y poco del calcio, viendose también afectada por la naturaleza del medio de cultivo y condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. Estos autores afirman que la expresión del plásmido es máxima a 37°C, detectando a esta temperatura hasta 16 polipéptidos 5 de los cuales formarían parte de la membrana externa, pero incluso a 22°C aparecerían algunos de ellos. BOLIN et al. (1988) detectan en preparaciones de membrana externa del serogrupo 0:8 crecido a 37°C y en presencia de calcio Yop2, Yop4 y Yop5, por medio de técnicas de inmunoblotting, no siendo detectadas por técnicas menos sensibles como tinción de proteínas en SDS-PAGE, lo que indica que la presencia de calcio no reprime totalmente la aparición de estos polipéptidos; de hecho, han podido detectarse Yops en bacterias crecidas "in vivo" en el fluido intraperitoneal donde el nivel de calcio es relativamente elevado (SKURNIK, 1985; HANSKI et al., 1991). La expresión del plásmido de virulencia se ve así mismo favorecida por un aporte suplementario de oxígeno

durante su crecimiento a 37°C (GRÖNBERG y KIHSTRÖM, 1989).

El panorama sobre las OMPs de *Y. enterocolitica* se complica con la aparición de nuevos resultados sobre la existencia de algunas de éstas independientes del plásmido (PIOMPs) en los serogrupos 0:8, 0:9, 0:5 y 0:2, con pesos moleculares entre 38 y 45 Kdal, expresándose a 22°C y reprimibles total o parcialmente por crecimiento a 37°C (KAPPERUD, 1985^b). CHANG y DOYLE (1984) empleando geles de baja concentración de poliacrilamida detectan en cepas del serogrupo 0:8 dos nuevas PIOMPs de 250 Kdal y 192 Kdal expresadas sólo a 37°C y que relacionan con la capacidad de adhesión a células HeLa. Por otra parte la expresión de Yops influye negativamente en la aparición de otras proteínas de membrana externa codificadas por el cromosoma bacteriano con pesos moleculares de 37-39 Kdal y 36-37 Kdal, apareciendo por tanto en cepas virulentas sólo a 22°C y en avirulentas a cualquier temperatura; han sido identificadas como porinas y OmpA respectivamente (ZALESKA et al. 1985). Recientemente, se ha confirmado que la banda inmediatamente superior a la homóloga de OmpA en SDS-PAGE corresponde en realidad a dos porinas llamadas YompC y YompF, relacionadas con la permeabilidad a antibióticos beta-lactámicos (BRZOSTEK y NICHOLS,

1990).

La síntesis de Yops, no sólo se ha detectado "in vitro" sino también "in vivo", pues los correspondientes anticuerpos aparecen en enfermos de yersiniosis o en animales previamente inmunizados o infectados con cepas de *Y. enterocolitica* portadoras del plásmido crecidas a 25°C, aunque no todos los sueros ensayados reconocen las mismas proteínas debido muy probablemente a la variación individual de la respuesta frente a la infección (MARTINEZ, 1983; BOLIN et al., 1985). En cuanto a la síntesis "in vitro" de Yops por otras especies del género *Yersinia* ha sido puesta de manifiesto en *Y. pseudotuberculosis* (BOLIN et al., 1982; PORTNOY et al., 1984), encontrándose las mayores diferencias con respecto a *Y. enterocolitica* en la Yop4 que mientras en ésta suele tener un peso molecular de 36 Kdal en *Y. pseudotuberculosis* tiene un peso molecular de 34 Kdal (BOLIN et al., 1985). FORSBERG et al. (1987) separan las Yops producidas por *Y. pseudotuberculosis* en siete polipéptidos (Yop1 de 47 Kdal -monómero-, Yop2a y Yop2b de 34 Kdal, Yop3 de 41 a 42 Kdal, Yop4a y Yop4b de 34 Kdal y Yop5 de 26 Kdal), Yops que también han sido detectadas en el serogrupo 0:8 de *Y. enterocolitica*, encontrándose las mayores diferencias con respecto

a la anterior en las Yops 2a y 2b (con pesos moleculares de 44 y 46 Kdal respectivamente), Yop3 (40-41 Kdal), Yop4b (36 Kdal) y Yop5 (25 Kdal) (BOLIN et al., 1988). En el caso de *Y. pestis*, no han podido detectarse OMPs específicas para cepas virulentas crecidas "in vitro" a 37°C (PORTNOY et al., 1984) pues éstas son degradadas por una actividad fibrinolisisina codificada por el plásmido (SODEINDE et al., 1988), pero si se ha detectado su producción "in vivo", pues sueros de individuos convalecientes de peste reconocen Yop4 y Yop5 (YopD y YopE) y sueros de ratones infectados con esta bacteria reconocen Yop2, Yop3 y Yop5 (YopB, YopC y YopE) (BOLIN et al., 1985), e incluso se han detectado las Yops 2, 4 y 5 en preparaciones de membrana externa de *Y. pseudotuberculosis* a las que previamente se le había introducido por transducción el plásmido PYV019 de *Y. pestis* lo que indica que el plásmido de las tres especies contienen la información necesaria para la producción de Yops (WOLF-WATZ et al., 1985).

En 1984 HEESEMANN et al. detectan proteínas en sobrenadantes de cultivos de cepas de *Y. enterocolitica* portadoras del plásmido de virulencia crecidas a 37°C en medios limitados en calcio; estas proteínas tenían una movilidad electroforética similar a las Yops,

lo que hizo suponer a PORTNOY et al. (1984) que se trataba del propio material de la membrana externa secretado también al medio de cultivo. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores como CHALVIGNAG et al. (1988), quienes detectan en sobrenadantes de cultivos de la cepa IP383 (serogrupo 0:9) crecidos a 37°C en medios deficientes en calcio tres polipéptidos con pesos moleculares de 47 Kdal, 36 Kdal y 25 Kdal, coincidiendo con los pesos moleculares de las Yops presentes en la membrana externa de esta cepa crecida a 37°C, a excepción de la Yop1 (140 Kdal) que no es secretada al medio pero que si aparece en la membrana externa. La presencia de Yops en sobrenadantes de cultivos limitados en calcio a 37°C también tiene lugar en *Y. pseudotuberculosis* (BOLIN et al., 1988; FORSBERG et al., 1987) y en *Y. pestis* (STRALEY y BOWMER, 1986; BOLIN et al., 1988). Un cambio sustancial en la visión sobre las Yops tiene lugar con las aportaciones de MICHIELS et al. (1990) quienes ponen de manifiesto que éstas no son auténticas OMPs, sino que se trata de proteínas secretadas al medio y por tanto su detección en extractos antígenicos se debe a fenómenos de adsorción de estas proteínas secretadas sobre la superficie bacteriana o bien su aparición en estos extractos resulta de la copurificación de agregados de Yops extracelulares junto con la membrana celular, no

ocurriendo esto en el caso de la Yopl que sí sería una auténtica OMP; estos autores encuentran en la cepa mutante W22703 perteneciente al serogrupo 0:9 un total de once proteínas secretadas al medio de cultivo con pesos moleculares 84, 41, 54, 37, 35, 30, 25, 48, 41 Kdal (identificada como antígeno V), 20 y 17 Kdal, teniendo las siete primeras caracter hidrófobo formando por tanto agregados, mientras que las restantes tienen cierto caracter hidrosoluble pudiendo perderse en los procesos de lavado.

El mecanismo por el que estos productos codificados por el plásmido influyen en la virulencia ha sido investigado por diversos autores como MARTINEZ (1983) para quien las OMPs codificadas por el plásmido son las responsables del no internamiento de las cepas portadoras del plásmido de virulencia en células epiteliales humanas "in vitro", y por tanto podrían jugar un papel antifagocítico importante en la lámina propia intestinal del individuo. LACHICA et al. (1984) encuentran que las cepas con plásmido crecidas a 37°C muestran al microscopio electrónico de transmisión una estructura fibrilar superficial distinta a las fimbrias y que serían responsables de la autoaglutinación e hidrofobicidad; nada de esto aparece en cepas con plásmido a 22°C

ni en cepas sin plásmido a cualquier temperatura. Estas fibrillas estarían formadas por Yopl, proteína por tanto que estaría involucrada en la autoaglutinación; también se ha visto su implicación en su actividad MHRA (KAPPERUD et al., 1985^a). Este papel de la Yopl sería confirmado por KAPPERUD et al. (1987) quienes observan como la inactivación del gen *yopA* (gen que codifica Yopl) conduce a una pérdida en la presencia de fibrillas y a una pérdida en la capacidad de autoaglutinación a 37°C así como una disminución en la capacidad de *Y. enterocolitica* para colonizar el intestino, lo que significaría que esta proteína jugaría un papel importante en adhesión a células de mamífero. En este mismo sentido, Yopl actuaría promoviendo la adhesión y penetración de la bacterias en el mucus intestinal, produciéndose por esta interacción un cambio del carácter hidrófobo de la superficie de la bacteria a un carácter hidrofílico lo que sería útil para la unión de la bacteria a la superficie del enterocito (PAERREGAARD et al., 1991^a). PAERREGAARD et al., 1991^b confirman el papel de Yopl en la adhesión de *Y. enterocolitica* al epitelio intestinal, al comprobar como la inactivación de *yopl* provoca una disminución en la capacidad adhesiva de las cepas virulentas, siendo similar a la que presentan derivados isogénicos avirulentos. Por otro lado aunque la acción

invasiva de *Y. enterocolitica* depende de determinante cromosómicos y no plasmídicos, la expresión del plásmido y sobre todo la aparición de YopI actuaría inhibiendo la acción protectora de IFN alfa sobre la invasividad (BUKHLÖM et al., 1990). Sin embargo, BRUBAKER (1991) no considera esta proteína esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica*, aunque por esta actuación de favorecer la adhesión al epitelio intestinal, estaría en relación con la aparición de formas crónicas de yersiniosis.

Otro posible factor de virulencia en *Y. enterocolitica* portadora del plásmido de virulencia podría estar en relación con la resistencia a la acción bactericida del suero humano fresco que presentan las cepas con plásmido crecidas a 37°C (PAI y DE STEPIANO, 1982), resistencia que permitiría a la bacteria sobrevivir y expandirse en el hospedador. Sin embargo el hecho de que el suero fresco de ratón no presente efecto bactericida sobre *Y. enterocolitica* y el que la depleción del complemento en éstos no afecte a la colonización por la bacteria del tejido intestinal, hacen suponer que no sea el complemento el que elimine la bacteria, al menos en el serogrupo 0:8 (HANSKI et al., 1991). MARTINEZ (1983) ha puesto de manifiesto que esta resistencia es debida a las CMPs

mediadas plasmidicamente, pues el tratamiento de las bacterias crecidas a 37°C con pronasa disminuye sensiblemente esta resistencia. Concretamente la proteína más directamente implicada en este aspecto es la YopI, lo que confirma MARTINEZ (1989), introduciendo por transformación el fragmento de DNA plasmídico que codifica YopI (previa recombinación de este fragmento con un plásmido vector de amplio espectro) en células de *E. coli* sensibles al suero, obteniendo transformantes que expresaban en su membrana externa YopI y adquirían resistencia a la acción bactericida de suero humano. Sin embargo en esta resistencia, además de la YopI influyen otros factores plasmídicos pues cepas sin plásmido son menos resistentes que cepas con plásmido en los que no se expresa *yopA* (PILZ et al., 1992). Se ha propuesto que el mecanismo por el que este polipéptido confiere esta resistencia está en relación con la inhibición de la activación del complemento a nivel de las fracciones C3 (por lo que se afectaría tanto la vía clásica como la vía alternativa de activación) y C9; sobre la fracción C3 actúa degradando C3b en su superficie, no afectándose su deposición en la superficie bacteriana, mientras que si afecta a la deposición sobre ésta de C9 y por tanto disminuye la formación de C5b-9 en la superficie de la bacteria (PILZ et al., 1992). Otros autores como

WACHTER y BRADE (1989) contradicen estas afirmaciones, afirmando que las OMPs codificadas por el plásmido de virulencia no juegan ningún papel en la inhibición de la activación del complemento por la vía alternativa, y asignándole esta propiedad al LPS.

No obstante, no son estos los principales mecanismos de virulencia conferidos por las Yops, sino que su principal función parece estar relacionada con la protección de las bacterias que alcanzan la lámina propia y nódulos linfáticos frente a la fagocitosis. En este aspecto las experiencias realizadas por LIAN y PAI (1985) sobre fagocitosis de *Y. enterocolitica* por PMN con el empleo de técnicas de quimioluminiscencia ponen en de manifiesto que las Yops juegan un papel antifagocitario o bien actuarían bloqueando el metabolismo oxigenado del PMN, corroborándose posteriormente este efecto antifagocitario "in vivo" mediante microscopía electrónica (LIAN et al., 1987). ROSQVIST et al. (1988) atribuyen esta resistencia a la fagocitosis a Yop2b, confirmándolo mediante inactivación del gen *yopH*, observando como esta inactivación conduce a la pérdida de resistencia de *Y. pseudotuberculosis* frente a fagocitosis por macrófagos peritoneales murinos. estos resultados pueden muy bien ser aplicados al caso de

Y. enterocolitica dónde también se ha detectado Yop2b (46 Kdal) en el serogrupo 0:8 (BOLIN et al., 1988) o también llamada Yop51 por MULDER et al. (1989) en el serogrupo 0:9. Esta acción antifagocitaria es debida a la acción tirosina fosfatasa que posee Yop2b (BRUBAKER, 1991). MULDER et al. (1989) consideran también a Yop20 y Yop48 esenciales para la virulencia, pues mutantes afectados en la producción de ambas ven sensiblemente disminuida su virulencia para ratones tratados con deferroxiamina.

Yop5 es así mismo una proteína requerida para la virulencia, responsable del efecto citotóxico para células HeLa (referido por FORSBERG y WOLF-WATZ, 1990). Su papel fisiológico no ha sido aclarado, aunque se sabe que cepas de *Y. pestis* con el gen *yopE* inutilizado pierden virulencia cuando se administran al ratón por vía intraperitoneal (por vía intravenosa se mantiene la virulencia); es interesante resaltar que la virulencia perdida se restaura por administración simultánea de hierro (el cual bloquea defensas del hospedador), lo que puede interpretarse en el sentido de que Yop5 actúe bloqueando también las mismas defensas inhibidas por el hierro (BRUBAKER, 1991).

4.4.- GENES PLASMIDICOS. RELACION CON OTROS PLASMIDOS DE *YERSINIA*

Aunque no totalmente idénticos la elevada homología existente entre los plásmidos de virulencia presentes en los distintos serogrupos de *Y. enterocolitica* así como de estos con los de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, apuntan a un ancestro común, en los que los distintos caminos evolutivos han marcado diferencias (PORTNOY et al., 1981).

Esta homología es especialmente marcada entre los serogrupos 0:3, 0:9 y 0:5,27, alcanzando alrededor del 90% del DNA plasmídico (HEESEMANN et al., 1983; LAROCHE et al., 1984); pero cuando se comparan éstos con el serogrupo 0:8 desciende al 75% (HEESEMANN et al., 1983). El DNA plasmídico del serogrupo 0:8 comparte un 55% con el de *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (PORTNOY y FALKOW, 1981).

En el plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica* se localiza una zona de unas 20 Kb responsable de la dependencia de calcio para crecer a 37°C (PORTNOY et al., 1984). Esta región aparece especialmente conservada en las tres especies patógenas del género

Yersinia estando constituida por los fragmentos de restricción BamH1 5, 7 y 8 en *Y. pestis* (PORTNOY y FALKOW, 1981), BamH1 6, 7 y 8 en *Y. pseudotuberculosis* (PORTNOY et al., 1984) y por los fragmentos BamH1 5, 6 y 7 en *Y. enterocolitica* serogrupo 0:9 (BALDWIN et al., 1985) y 4, 5 y 6 en el serogrupo 0:8 (PORTNOY et al., 1984).

La región de dependencia de calcio está claramente involucrada en la regulación de la transcripción de los genes *yop* los cuales codifican proteínas presentes en membrana externa y en sobrenadantes de cultivos crecidos a 37°C en ausencia de calcio (BOLIN et al., 1985). En el plásmido de *Y. enterocolitica*, los genes implicados en el control de la transcripción de las Yops se denominan genes *vir*. Inicialmente se localizaron en la zona de la dependencia de calcio los loci *vir A*, *vir B* y *vir F* (CORNELIS et al., 1986). Posteriormente se identificó otra unidad de transcripción o *vir F* localizada también en la misma región que los anteriores y concretamente entre *vir B* y *vir C* (CORNELIS et al., 1987^b). En 1989, CORNELIS et al. encuentran que el producto de expresión de *vir F* es una proteína de cerca de 31 Kdal, producida a 37°C e independiente de la presencia de calcio en el medio, siendo esta la responsable de

la activación de la transcripción de los genes *yop*. Mutantes afectados en *vir A* o *vir B* no requieren calcio para crecer a 37°C, mientras que si la mutación es a nivel de *vir C* o *yopD* (codifica Yop37) la bacteria es incapaz de crecer a 37°C incluso en presencia de calcio en el medio (CORNELIS et al., 1986).

Estas unidades de transcripción, también han sido identificadas en la zona de dependencia de calcio del plásmido de *Y. pestis*, donde se han denominado *Icr A*, *Icr B*, *Icr C* e *Icr F* (GOGUEN et al., 1984), siendo *Icr F* el implicado en la transcripción termodependiente de los genes *yop* (STRALEY y BOWMER, 1986). Así mismo, en el plásmido de virulencia de *Y. pestis* se han identificado dos nuevos *loci* en el *locus Icr A* llamados *Icr D* e *Icr E*, siendo éste último el que codifica un sensor para el calcio (YOTHER y GOGUEN, 1985). Activador de la transcripción también identificado en *Y. pseudotuberculosis* (FORSBERG y WOLF-WATZ, 1988; BOLIN y WOLF-WATZ, 1988).

El calcio afecta por tanto poco a la transcripción de genes estructurales *yop* en *Y. enterocolitica*, pero su influencia a este nivel si se deja notar en *Y. pestis* (STRALEY y BOWMER, 1986) y *Y.*

pseudotuberculosis (BOLIN y WOLF-WATZ, 1988). En *Y. enterocolitica* este papel decisivo corresponde a la temperatura, de modo que los genes *yop* ven incrementada su transcripción aunque en distinta cuantía para unos y otros genes, por el paso de una temperatura de 22°C a 37°C, y es afectada poco por el calcio, a excepción de *yopA* que no se verá en absoluto afectado; la influencia del calcio a 37°C sería básicamente a nivel post-transcripcional, es decir, su presencia inhibiría la traslación de Yops o su excreción al medio de cultivo (CORNELIS et al., 1987^b).

A pesar la elevada homología encontrada en la zona de dependencia de calcio en el plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, si existe una mayor diferencia en la localización de los genes de replicación y en la localización de los genes estructurales *yop* en los plásmidos de virulencia de las tres especies patógenas. Así PORTNOY y FALKOW (1981), mediante el análisis de mutantes espontáneos de *Y. pestis* que han perdido por delección la dependencia de calcio para crecer a 37°C, encuentran los genes de replicación en el fragmento de restricción BamH1 6, mientras que en *Y. enterocolitica* se encuentra en el fragmento BamH1 3 con un tamaño de 4 Kb, y con un tamaño de

6,6 Kb y localizado en BamH1 4 en *Y. pseudotuberculosis* (PORTNOY et al., 1984). HEESEMANN et al. (1983) encuentran una baja homología en esta región entre el serogrupo 0:8 y 0:9 en *Y. enterocolitica*; ambos son termodependientes, pero mientras que el replicón del plásmido de virulencia en el serogrupo 0:8 no es funcional a 37°C (PORTNOY et al., 1984), si lo es aunque mínimamente el del serogrupo 0:9 (CORNELIS et al., 1987^a). CORNELIS et al. (1987^a) apuntan a que este cambio en la posición de los genes de replicación en las tres especies del género *Yersinia* pudiera deberse a deleciones, inserciones o inversiones en la zona del plásmido que contiene estos genes en el transcurso evolutivo.

Mayores diferencias aparecen en la posición de los genes estructurales *yop* dentro del plásmido de virulencia; BALLIGAN et al. (1985) localizan *yopA* en el fragmento de restricción BamH1 4 en el serogrupo 0:9 de *Y. enterocolitica*, apareciendo en BamH1 1 en el serogrupo 0:8 (BOLIN et al., 1988). En *Y. pseudotuberculosis* se encuentra localizado en BamH1 10 (FORSBERG et al., 1987). Esta región de DNA plasmídico que corresponde al gen estructural *yopA* esta presente en *Y. pestis* pero por defectos en la regulación y/o en el gen es incapaz de expresarlo (BOLIN et al., 1988).

CORNELIS et al. (1986, 1987^o) por medio de mutaciones por transposición con el transposón Mini *mulac* y posterior análisis con endonucleasas de restricción consiguen mapear los genes estructurales *yop* en el serogrupo 0:9 de *Y. enterocolitica*: *yop51* se localiza en BamH1 1 / EcoR1 3 y *yop25* en BamH1 1 / EcoR1 2 transcribiéndose ambos en el sentido de las agujas del reloj; mientras que *yop84* y *yop30* se localizarían en los fragmentos de restricción BamH1 3 y 11 y BamH1 11 y 13 respectivamente, formando ambos genes una unidad de transcripción la cual también se efectuaría en igual sentido a los anteriores. En 1989 MULDER et al. localizan nuevos genes, *yop48*, *yop44* e *Icr V* (que codifica el antígeno V) en BamH1 2, afirmando que los tres genes junto con *yop37*, llamado por CORNELIS et al. (1986) *yopD*, forman parte de un mismo operón denominándolo operón *car* (involucrado en la regulación por el calcio) adyacente a *vir A* y con sentido de transcripción de *Icr V* a *yop37*, incrementándose su transcripción por el paso de 22°C a 37°C y afectándose poco por el calcio.

FORSBERG et al. (1987) mapean los genes estructurales que codifican el antígeno V y *Yop* en *Y. pseudotuberculosis* localizándolos fuera de la zona de dependencia de calcio a excepción

de *yop4b* (34 Kdal). BOLIN et al. (1988) mapean estos genes en *Y. pestis* y *Y. enterocolitica* serogrupo 0:8, no encontrando diferencias al comparar sus resultados entre *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*, pero si con respecto a *Y. enterocolitica* serogrupo 0:8, dónde se observan diferencias intra y extragénicas; apreciándose las mayores diferencias con respecto a *Y. pseudotuberculosis* en la localización de *yop5*. La región del plásmido que contiene los genes que codifican *Yop3* y *Yop4a* en *Y. pseudotuberculosis* y serogrupo 0:8 de *Y. enterocolitica* aparece especialmente conservada en ambas especies (BOLIN et al., 1988); región que también se ha caracterizado en *Y. pestis* (PERRY et al., 1986).

Estudios de distinta índole realizados en el serogrupo 0:8 de *Y. enterocolitica* por MILIOTIS et al. (1990), ponen de manifiesto que el efecto citotóxico frente a la línea epitelial humana HEP-2, así como la positividad en el test de Séreny presentadas por las cepas portadoras del plásmido de virulencia conferidos por una región de éste de 2,8 Kb localizada en el fragmento de restricción BamH1 7, no conociéndose sin embargo su producto de codificación. La citotoxicidad para células en cultivo también es conferida por el plásmido de virulencia en *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* (GOGUEN

et al., 1986; ROVQUIST et al. 1986) encontrándose el fragmento de restricción BamH1 7 especialmente conservado en la tres especies (MILIOTIS et al., 1989; ROBINS-BROWNE et al., 1989). A pesar de la involucración de este fragmento en la virulencia por *Y. enterocolitica*, mutantes de delección que carecen de él así como de una región adyacente de 0,5 Kb, se muestran más virulentos y con una diseminación más rápida en modelos murinos, lo que podría deberse a que este fragmento actúe de algún modo reprimiendo la diseminación de la bacteria en el huesped o bien a que su falta origine la pérdida de alguna propiedad superficial, lo que finalmente dificultaría la opsonización del microorganismo (MILIOTIS et al., 1990).

I.5.-HIERRO Y *Y. enterocolitica*

El hierro constituye un factor de crecimiento indispensable para la mayor parte de las bacterias, y aunque los requerimientos bacterianos de este elemento pueden satisfacerse con las trazas presentes en los medios de cultivo, son mucho más difíciles de resolver cuando la bacteria se encuentra en los tejidos de un mamífero, dado que en tal caso la disponibilidad de hierro se encuentra limitada por la formación de complejos con proteínas como la transferrina en suero o la lactoferrina en secreciones mucosas (WEINBERG, 1978; CROSA, 1984).

Una estrategia desarrollada por muchos microorganismos para cubrir sus necesidades de hierro en aquellos medio con poco hierro o más bien con poco hierro libre ha sido la producción de sideróforos (PAYNE, 1980; PERRY y SAN CLEMENTE, 1979). Se trata de moléculas de bajo peso molecular de estructura química muy diversa que se caracterizan por una elevada afinidad por el hierro, capaces de desplazarlo de su unión a otras moléculas y pasarlo al interior bacteriano gracias a receptores específicos de membrana. La producción de sideróforos desde esta perspectiva puede

considerarse como factor de virulencia, pues serían necesarios para el crecimiento "in vivo" de la bacteria (ROGERS, 1973).

En lo que respecta a microorganismos del género *Yersinia* WAKE et al. (1975) mostraron evidencias indirectas de la producción de sideróforos por *Y. pestis*; sin embargo estos quelantes del hierro no se han identificado. PERRY y BRUBAKER en 1979 establecieron que *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*, no son capaces de producir sideróforos, pero pueden acumular hierro en su interior para una posterior adaptación a medios con limitación en éste. Estos autores encuentran que *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* pueden utilizar sideróforos exógenos (desferal, aerobactin, enteroquelina) pero no así *Y. pestis*; las tres especies citadas pueden usar hemina como única fuente de hierro y mientras que las dos primeras pueden utilizar también hierro inorgánico, *Y. pestis* necesitaría una combinación de hierro inorgánico con protoporfirina. Sin embargo si se ha encontrado producción de sideróforos (aerobactin) en las especies *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* y *Y. fredericksonii* (STUART et al., 1986).

La administración a ratones de hierro-dextrano o desferal

(desferroxiamina B) incrementa su susceptibilidad a la infección tanto oral como intraperitoneal por cepas de *Y. enterocolitica* de los serogrupos O:9 y O:3, no viéndose afectada de manera significativa para las del serogrupo O:8, de por sí altamente virulentas para el ratón; esto puede interpretarse en el sentido de que estas cepas requieran menos hierro o que se lo procuren con mayor eficacia que cepas de los serogrupos O:3 y O:9 (ROBINS-BROWNE y PRPIC, 1985). Basándose en estos conocimientos, numerosos autores han recurrido al tratamiento de animales con desferroxiamina para conseguir modelos de infección experimental empleando dosis razonablemente bajas de cepas O:3 y O:9.

Por otra parte, la importancia de la disponibilidad de hierro para ciertos serogrupos de *Y. enterocolitica* justifica el hecho bien conocido en clínica de que los enfermos con sobrecarga de hierro plasmático (hemosiderosis, cirrosis) están expuestos a una mayor incidencia de yersiniosis extraintestinal (RABSON et al., 1975; ROBINS-BROWNE et al., 1979; BOUZA et al., 1980).

Estudios de distinta naturaleza llevados a cabo por CARNIEL et al. (1987) demuestran la producción de dos proteínas de membrana

externa de alto peso molecular (HMWPs) por *Y. enterocolitica* crecida en condiciones limitantes en hierro, encontrando una relación entre síntesis de estos dos polipeptidos y virulencia; así, se encuentra que es producida por serogrupos altamente virulentos (O:8) pero no por aquellos de baja virulencia (O:9 y O:3), atribuyendoles un posible papel de transportador del sideróforo a nivel de membrana. Estas HMWPs están codificadas por genes cromosómicos termcindependientes, y muestran epítomos comunes entre las producidas por otras especies virulentas como *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* (CARNIEL et al., 1989).

I.6.-GENES CROMOSOMICOS Y VIRULENCIA

La capacidad de *Y. enterocolitica* para invadir el epitelio intestinal y tener acceso al sistema reticulo endotelial es un importante aspecto en la virulencia de esta bacteria, siendo este caracter invasivo conferido por el cromosoma y no por el plásmido, y de aquí que la eliminación del plásmido de virulencia no conlleve la perdida de las propiedades invasivas (HESSEMAN et al., 1984; PORTNOY et al., 1981). Esto concuerda con la idea de que el plásmido de virulencia es indispensable, pero no suficiente para conferir virulencia a una cepa (HESSEMAN et al., 1984).

En 1988 MILLER y FALKOW consiguen la clonación de dos genes cromosómicos necesarios para la invasividad "in vitro" a los que denominan *inv* y *ail*; el primero de ellos, *inv*, permite un alto grado de invasión de células en cultivo, uniforme para diversas líneas celulares y presentando una elevada homología con el correspondiente en *Y. pseudotuberculosis*; mientras que el gen *ail* confiere mayor especificidad por el hospedador, permitiendo la infección de determinadas líneas celulares (HEp-2, CHO, HEC-1B) pero no de otras (MDCK). En un trabajo posterior, MILLER et al.

(1989), utilizando técnicas de hibridación de fragmentos de DNA cromosómico con sondas para los genes *inv* y *ail*, encuentran que todas las cepas pertenecientes a serogrupos patógenos invasivos examinadas por ellos poseen DNA que hibrida con las sondas de *ail*, mientras que las cepas de serogrupos no patógenos (no invasivas) dan negativa la hibridación. Con la sonda de *inv* la situación es más compleja, ya que tanto las cepas de serogrupos patógenos como las ambientales dan algún grado de hibridación, pero entre los fragmentos que hibridan, hay dos que están presentes sólo en las cepas de serogrupos patógenos, y no en las ambientales; este hecho se interpreta admitiendo que hay polimorfismo para el locus *inv*, y posiblemente algunos de los alelos (presentes en cepas ambientales) no sean funcionales. Varios hechos apoyan esta hipótesis: las cepas no patógenas con secuencias *inv* homólogas a las presentes en cepas invasivas (virulentas) no son invasivas; transformantes de *E. coli* portadores de un plásmido recombinante con el fragmento *inv* homólogo de cepas ambientales no adquieran un fenotipo invasivo, lo que sí ocurre en el caso de que el recombinante transporte el gen *inv* de cepas patógenas; y finalmente, no se ha detectado el producto de transcripción de este fragmento en cepas ambientales, (PIERSON y FALKOW, 1990). El locus *inv* codifica una proteína presente en la

membrana externa con peso molecular de 92 Kdal similar a la invasina presente en *Y. pseudotuberculosis*, con la que ofrece una fuerte reacción cruzada, siendo la responsable de la invasión de la bacteria a células en cultivo (MILLER et al., 1990); mientras que el gen *ail* codifica una proteína de 17 Kdal, también presente en la membrana externa aunque el mecanismo por el que ésta actúa en la invasividad permanece desconocido (PEPE y MILLER, 1990).

OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación sobre interacciones entre *Yersinia enterocolitica* y el sistema inmune, que se inició con las primeras descripciones de actividad modificadora de la respuesta biológica en esta bacteria (RUIZ-BRAVO, 1980). Desde entonces, se han sucedido los estudios sobre este tema, plasmados en diversas Tesinas de Licenciatura, Tesis Doctorales, comunicaciones a Congresos científicos y publicaciones en Revistas especializadas. Centrada en un principio la atención en la influencia ejercida por la infección experimental con *Y. enterocolitica* sobre la inmunidad no específica y sobre la respuesta inmune específica frente a antígenos no relacionados, el desarrollo de las investigaciones puso de manifiesto la necesidad de obtener información sobre la respuesta inmune específicamente inducida por la propia bacteria. Esta Tesis se incluye en un Proyecto de investigación dirigido tal fin (Proyecto "Respuesta Inmune a la Infección por *Y. enterocolitica*", DGICYT nº PM90-0143). Además de sentar las bases para una posterior exploración de aspectos de gran importancia, como la posible existencia de reacciones cruzadas o, de acuerdo con conceptos más recientes, de superantígenos, que expliquen algunas de las propiedades inmunomoduladoras de la bacteria, el conocimiento de las fracciones antigénicas de las yersinias facilitará la producción y caracterización de anticuerpos

monoclonales, instrumentos necesarios para progresar en la línea que nos ocupa. Finalmente, no debe olvidarse que se trata de una bacteria patógena del ser humano, y que su mejor conocimiento, desde el punto de vista inmunológico, puede tener aplicaciones interesantes en diagnóstico y/o terapia de las infecciones que causa y de las secuelas de las mismas.

La presente Tesis se ha centrado en el estudio de la respuesta humoral suscitada por proteínas superficiales del par isogénico IP383 e IP383p- (virulenta y avirulenta respectivamente) perteneciente al serogrupo 0:9, y se ha desarrollado de acuerdo con los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización de los perfiles de OMPs mediante electroforesis vertical en poliacrilamida e inmunoblotting, estableciendo las condiciones técnicas óptimas para su estudio.

2. Análisis por inmunoblotting de la respuesta de anticuerpos a las Yops en ratones infectados por vía oral.

3. Estudio de la respuesta de anticuerpos frente a OMPs cromosómicas, comunes a ambas cepas, para establecer la influencia

del plásmido de virulencia en dicha respuesta.

4. Estudio de las posibles reacciones cruzadas entre las OMPs del serogrupo 0:9 y las de otros serogrupos.

5. Investigación de la presencia de inmunocomplejos en el suero de ratones infectados oralmente, y de la participación en ellos de OMPs.

6. Estudio de la influencia del plásmido de virulencia en la respuesta inflamatoria a la infección oral, mediante cuantificación de actividad CSF (factor estimulador de la formación de colonias por células de médula ósea).

MATERIAL Y METODOS

III.1.-BACTERIAS

Se han utilizado las cepas de *Y. enterocolitica* IP383 e IP1476, procedentes de la Colección del Centre National des Yersinia del Institut Pasteur (Paris). La primera de ellas, pertenece al serogrupo O:9, biogrupo 2, aislada de heces humanas y con un plásmido de virulencia de 47 Mdal; expresándose a 37°C marcadores del mismo como son la autoaglutinación y dependencia de calcio para crecer (MAZIGH et al., 1983); la segunda pertenece al serogrupo ambiental O:4,33. La cepa IP383p- (carente de plásmido de virulencia) obtenida en nuestro laboratorio a partir de IP383 (RUIZ-BRAVO et al., 1986) por crecimiento en TSA-MOX (limitado en calcio) a 37°C. La cepa O25, serogrupo O:3 (portadora de plásmido de virulencia) fué cedida gentilmente por el Dr. R. Díaz (Hospital Clínico de Navarra, Universidad de Navarra); la cepa O:25p- (carente de plásmido de virulencia) fué obtenida por nosotros de igual forma que la IP383p-.

III.2.-OBTENCION DE ANTIGENOS

2.1.-MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados para la obtención de masa bacteriana a partir de la cual se obtendrían los extractos proteicos han sido los siguientes:

-BHI (DIFCO) suplementado con sulfato magnésico y glucosa.

Composición:

BHI	37 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	4.9g
glucosa	2 g
agua destilada c.s.p	1000 ml

Preparación: se disuelve el BHI deshidratado en agua destilada y se añade el sulfato magnésico heptahidratado (20 mM) y la glucosa (0.2%) agitando hasta su disolución. Se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

-RPMI 1640 (SIGMA).

Se disuelve el medio deshidratado en agua destilada a razón de 10.4 gramos por litro y se esteriliza por filtración a través de membrana millipore de 0.22 μm de diámetro de poro utilizando un sistema de presión positiva proporcionado por una bomba peristáltica.

-RPMI 1640 suplementado con HEPES.

Se ha utilizado el medio RPMI 1640 suplementado con 25 mM de HEPES suministrado por SIGMA.

2.2.-CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se conservaron en tubos de TSA a 4°C, en los que previamente se había sembrado la bacteria en picadura e incubado a 25°C durante 48 horas. Periodicamente se realizaron controles que aseguraban la presencia del plásmido en las cepas IP383 y O25 y su ausencia en la cepa IP383p- y O25p-. Estos controles consistieron en la observación de marcadores plasmídicos como son

la autoaglutinación en RPMI 1640 (SIGMA) a 37°C (LAIRD y CAVANOUGH, 1980), y el dimorfismo colonial en RPMI-agar a 37°C (MAZIGH et al., 1983).

Para la obtención de extractos constituidos por proteínas de envueltas totales, o bien, enriquecidos en proteínas de membrana externa (OMPs) de las cepas crecidas a 25°C, se sembraron las cepas virulenta y avirulenta en tubos de TSA inclinado, incubando a 25°C durante 24 horas; transcurrido este tiempo, las bacterias se suspendieron en 5 ml de solución salina estéril, inoculando 200 µl de esta suspensión por litro de medio de cultivo líquido (BHI suplementado) incubando a 25°C durante 18 horas.

La incubación de BHI suplementado, a 37°C durante 18 horas inoculado con las cepas IP383, IP383p-, O25, O25p- e IP1476 (obtenidas por crecimiento en TSA a 25°C durante 24 horas del mismo modo al descrito anteriormente), permitió obtener masa bacteriana para la consecución de extractos proteicos (de envueltas totales o de OMPs) de dichas cepas crecidas a 37°C. Además, se obtuvo masa bacteriana a partir de las cepas IP383 e IP383p- crecidas en RPMI 1640 a 37°C, y de la cepa IP383 crecida en iguales condiciones en

RPMI 1640 suplementado con HEPES. Por otro lado la misma cepa IP383p- obtenida por crecimiento en BHI suplementado con 20 mM de sulfato magnésico y 0,2% p/v de glucosa, a 37°C se utilizó para conseguir antígeno constituido por bacterias enteras tanto formolado como autoclavado. Los antígenos autoclavados y formolados serían empleados en la adsorción de sueros anti *Y. enterocolitica* obtenidos previa inmunización intraperitoneal.

2.3.-EXTRACTO PROTEICO DE ENVUELTAS TOTALES

Las bacterias crecidas en medio líquido se recogieron por centrifugación a 9500 x g durante 15 minutos a 4°C, en una centrífuga Sorvall RC-5B. A continuación se lavó el sedimento tres veces con solución salina estéril por centrifugación a 9500 x g durante 15 minutos.

En su caso, las bacterias recogidas fueron conservadas hasta su ruptura en BHI con un 20% v/v de glicerol a -70°C.

La masa bacteriana obtenida y mantenida en baño de hielo se resuspendió en cantidad suficiente de tampón de ruptura (Tris-HCl

10 mM, EDTA 5mM,(pH 7.8) 2-mercaptoetanol 1mM hasta formar una pasta, a la que se añadió RNAsa (SIGMA) y DNAsa (SIGMA) a una concentración de 50 µg/ml de cada enzima. La pasta se llevó a un bote rompedor (B. BRAUN) en el que previamente se habían puesto perlas de vidrio (B. BRAUN) de diametro 0.17-0.18 mm. La proporción entre el volumen de bacterias a romper y bola de vidrio fué 1:3. Las bacterias se rompieron, dentro de este bote, en un homogeneizador celular refrigerado MSK (B. BRAUN AG, Mesulgen, Alemania) llevándose a cabo dos ciclos de ruptura de 45 segundos cada uno (15 segundos refrigerado con CO₂ - 15 segundos sin CO₂ - 15 segundos con CO₂). La eficacia de la ruptura celular se comprobó mediante una tinción sencilla con Cristal Violeta, y en caso de no haberse obtenido un buen rendimiento se volvió a repetir el ciclo de ruptura.

Concluidos los ciclos de ruptura, el contenido del bote rompedor se llevó a una probeta, dónde se separaron las perlas de vidrio por decantación, realizando a continuación varios lavados de dichas perlas con tampón de ruptura. Las bacterias no rotas se separaron por centrifugación a 9500 x g durante 15 minutos a 4°C, y del sobrenadante resultante se recogieron las envueltas totales por centrifugación a 45000 x g durante 1 hora a 4°C. El sedimento

obtenido (envueltas totales) se lavó dos veces con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, y se resuspendió en este mismo tampón, determinándose a continuación la concentración de proteínas. Las envueltas se volvieron a recoger por centrifugación resuspendieron a continuación en tampón de muestra para SDS-PAGE (SDS 2%, glicerol 10%, 10 mM de Tris-HCl pH 6.8, 5% 2-mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromofenol) a concentración de 1 mg/ml y se congelaron a -20°C en alícuotas de 70 µl.

2.4-EXTRACTO ENRIQUECIDO EN OMPs

Las fracciones antigénicas enriquecidas en proteínas de membrana externa (OMPs) se consiguieron por una modificación del método de BOLIN et al. (1982) basado en la solubilización de la membrana interna o citoplásmica con lauril sarcocinato sódico (Sarkosyl) descrito por FILIP et al. (1973). También se han obtenido estos mismos extractos siguiendo la metodología empleada por MARTINEZ (1983), basada en la solubilización de membrana interna mediante el empleo de Tritón X-100 (SCHNAITMAN, 1971).

2.4.1-TRATAMIENTO CON SARKOSYL

Para la obtención de fracciones antigénicas enriquecidas en OMPs mediante este procedimiento, se tomaron 10 mg de proteínas de envueltas celulares totales -obtenidas por el procedimiento descrito en el apartado anterior- y se suspendieron en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 con 1% p/v de Sarkosyl (SIGMA) agitando con pipeta pasteur durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando en lo posible la formación de espuma. Transcurridos estos 30 minutos, las proteínas insolubles -proteínas de membrana externa- se recogieron por centrifugación a 45000 x g durante 15 minutos a 4°C, volviendo seguidamente a repetirse este tratamiento una vez más. El sedimento obtenido, de color blanco plateado, se lavó 2 veces por centrifugación a 4°C con Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. En su caso, esta fracción enriquecida en proteínas de membrana externa se sometió a continuación a una delipidización parcial, siguiendo el método descrito por GALANOS et al. (1969) para la extracción de LPS de bacterias en fase R, pero en este caso aplicado a fracciones de membrana externa. El proceso seguido fué el siguiente: fracciones de membrana externa conteniendo 1 mg de proteínas se trató con 15 ml de una mezcla de cloroformo:éter de petróleo:fenol (5:8:2)

agitando con pipeta pasteur durante 15 minutos centrifugándose a continuación a 4000 X g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento resultante fué lavado 3 veces de igual modo que en los casos anteriores, resuspendiéndose en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 dónde se determinó la concentración de proteínas. Las proteínas volvieron a recogerse por centrifugación, y se resuspendieron en tampón de muestra para SDS-PAGE a una concentración de 1 mg/ml, congelándose a -20 C en alicuotas de 70 µl.

2.4.2-TRATAMIENTO CON TRITON X-100

Se tomaron 10 mg de proteínas de envueltas totales y se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) MgCl₂ 5 mM, 2% v/v Tritón X-100 agitando con pipeta pasteur durante 30 minutos a temperatura ambiente. La fracción insoluble (proteínas de membrana externa) se recogió por centrifugación a 45000 x g durante 15 minutos a 4°C repitiendo este mismo tratamiento una vez mas. El sedimento obtenido se lavó 2 veces por centrifugación con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, determinándose seguidamente la concentración proteica y conservándose de igual modo al descrito en el apartado anterior.

2.5.-ANTIGENO AUTOCLAVADO Y ANTIGENO FORMOLADO

2.5.1-OBTENCION DE ANTIGENO AUTOCLAVADO

La cepa IP383p- crecida a 37°C durante 18 horas en BHI suplementado con 20 mM de sulfato magnésico y 0.2% p/v de glucosa, se recogió por centrifugación a 9500 X g durante 15 minutos a 4°C, lavándose seguidamente por centrifugación con PBS (solución salina -0.9% NaCl- con tampón de fosfatos -0.067 M-, pH 7.6). El sedimento resultante se resuspendió en PBS y se autoclavó a 115°C durante 20 minutos.

2.5.2-OBTENCION DE ANTIGENO FORMOLADO

Se obtuvo a partir de la cepa avirulenta obtenida y lavada en las mismas condiciones anteriores, resuspendiéndose las bacterias después de los lavados en PBS añadiendo 0.5% v/v de formol al 30%. La incubación en presencia de formol se efectuó a 4°C durante 24 horas, transcurridas las cuales las bacterias se lavaron con PBS dos veces por centrifugación.

2.6.-DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA

La determinación de proteínas se realizó por medio de un kit (Protein Assay. BIO RAD) basado en la técnica de Bradford (BRADFORD, 1976).

A partir de una solución standard de albúmina bovina (BIO RAD) de concentración 1.4 mg/ml se prepararon diluciones conteniendo 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml y 1 mg/ml. De cada dilución se pusieron 100 μ l en sendos tubos de vidrio y 100 μ l del extracto antigénico problema en otro tubo. Además se colocó un tubo con 100 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 que sería usado como blanco. A cada tubo se le añadió a continuación 5 ml de reactivo colorante (BIO RAD) previamente diluido 1:5 en agua destilada y filtrado por papel de filtro. Después de incubar un tiempo mínimo de 5 minutos se leyó la absorbancia de los tubos con concentración conocida y el problema frente al blanco a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3B.

III.3.-SUEROS

3.1.-ANIMALES

Como fuente de suero anti-*Y.enterocolitica*, sueros control negativos y suero control positivo para el cultivo de células de médula ósea, se han utilizado ratones machos BALB/c procedentes del Servicio de Animalario de la Universidad de Granada.

Los sueros de cabra y de conejo empleados en las soluciones diluyentes de anti-gammaglobulina marcada con biotina (SIGMA) y anti-gammagiulina marcada con peroxidasa (SIGMA) respectivamente se han obtenido a partir de cabras sanas del Centro de Experimentación Animal de la Diputación de Granada, y conejos procedentes del Servicio de Animalario de la Universidad de Granada.

3.2-SUEROS ANTI-*Y.enterocolitica*

Se han obtenido sueros de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con la cepa IP383 o bien con la IP383p-, así como

sueros de inmunización oral también de ambas cepas.

La cepa virulenta y avirulenta crecidas en TSA a 25°C durante 24 horas suspendidas en solución salina conteniendo 10^8 bacterias/ml, fué utilizada para la inmunización de los animales por vía intraperitoneal, recibiendo cada ratón 0.25 ml cada vez. Para la infección oral los animales se mantuvieron privados de agua durante 24 horas; trascurrido este periodo, se les permitió libre acceso a bebederos conteniendo un volumen suficiente de suspensión bacteriana (bacterias obtenidas por cultivo en TSA a 25°C durante 24 horas) en agua estéril con una concentración aproximada de 10^9 bacterias/ml. A las 24 horas se dio por terminada la infección oral, sustituyéndose los bebederos por otros no contaminados.

Los distintos sueros obtenidos han sido los siguientes:

Suero I: constituido por la mezcla de sueros procedente de un lote de animales inmunizados intraperitonealmente con la cepa IP383 4 veces, espaciada cada inmunización 15 días. El sacrificio de los ratones se realizó a los 5 días de la última inmunización.

Suero II: procedente de un lote de animales inmunizados y sacrificados de igual modo y mismos tiempos que el anterior pero con la cepa IP383p-.

Suero III: mezcla de sueros procedentes de un lote de animales sacrificados a los 2 dias de su infección oral con la cepa IP383.

Suero IV: procedente de un lote de animales infectados con la cepa IP383p- de igual modo al anterior y sacrificados también a igual tiempo postinfección.

Suero V: formado por la mezcla de sueros procedentes de un lote de animales infectados oralmente con la cepa IP383, siendo sacrificados a los 5 dias de la infección.

Suero VI: procedente de un lote de animales sacrificados a los 5 dias de ser infectados oralmente con la cepa IP383p-.

Suero VII: mezcla de sueros de un lote de ratones

sacrificados a los 10 días de su infección oral con la cepa IP383.

Suero VIII: constituido por la mezcla de sueros procedentes de un lote de animales infectados oralmente con la cepa IP383p- y sacrificados a los 10 días de ser infectados.

Como suero control negativo se utilizó suero procedente de animales no inmunizados.

3.3.-SUERO CONTROL POSITIVO PARA CULTIVO DE CELULAS DE MEDULA OSEA

Se utilizó suero procedente de animales a los que se había inoculado por via intravenosa 0.1 ml de una solución de LPS (SIGMA) en PBS de concentración 50 µg/ml y sacrificados transcurridas 5 horas de la inoculación.

3.4.-SANGRIA, SEPARACION Y CONSERVACION DE LOS SUEROS

Los animales se sometieron a anestesia etérea profunda y se les practicó sangría en blanco por punción en el seno venoso retroorbital con pipeta pasteur, mezclando la sangre de los animales

de un mismo lote.

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante 4 horas y se separó el suero, eliminando restos de coágulos o elementos formes por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 15 minutos. Los sueros así obtenidos se conservaron hasta su utilización por congelación a -20°C .

III.4.-ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

4.1.-DESCRIPCION DE LA TECNICA

Se ha empleado un sistema de tampones y geles discontinuos (LAEMMLI, 1970) utilizando un gel superior de concentración y un gel inferior o gel de separación de 1.5 mm de espesor.

Para la elaboración de los geles de separación, se han empleado soluciones stock de poliacrilamida de concentración 29.2 p/v de acrilamida (BIO RAD) y 0.8% p/v de N,N'- metilenbisacrilamida (BIO RAD), de Tris-HCl (SIGMA) 1.5 M pH 8.8, y dodecil sulfato sódico

(SDS) (SIGMA) al 10% p/v.

Se ha trabajado con geles de separación de concentración final de poliacrilamida del 7.5%, 12.5% y geles en gradiente lineal con concentración de poliacrilamida de 7.5% a 15%. Para la elaboración de los primeros se mezclaron cantidades adecuadas de las anteriores soluciones stock de modo que sus concentraciones quedaron en 7.5% o 12.5% de poliacrilamida, 0.375 M de Tris-HCl pH 8.8 y 0.1% p/v de SDS. La mezcla se llevó a desgasificar 15 minutos a vacío y seguidamente se adicionaron los iniciadores de la polimerización: 0.05% p/v de persulfato amónico (adicionado a partir de una solución extemporánea del 10% p/v) y 0.15% de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) (BIO RAD), mezclándose bien todo y vertiéndose a continuación en un molde. En el caso de los geles en gradiente, se prepararon dos soluciones (cada una con la mitad del volumen total del gel): una de concentración final de poliacrilamida de 7.5% y otra del 15% y con una concentración de Tris-HCl pH 8.8 y SDS iguales que en el gel anteriormente descrito. Una vez realizada la desgasificación de ambas soluciones y adicionados los iniciadores (a igual concentración que en el caso de los geles de concentración constante de poliacrilamida) se

practicó su vertido en el molde, empleándose para este vertido un formador de gradientes modelo 385 (BIO RAD).

Una vez vertida la solución o soluciones entre los dos vidrios, molde del gel, se añadió lentamente con el empleo de pipeta pasteur agua o isopropanol para evitar la formación de meniscos, y se dejó polimerizar durante 45 minutos.

El gel superior se preparó a partir de las mismas soluciones stock de poliacrilamida y SDS, y una solución de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, de modo que la concentración final de estos componentes en el gel fué de 3% p/v de poliacrilamida, 0.125 M de Tris-HCl pH 6.8 y 0.1% de SDS. Después de desgasificar y añadir los iniciadores (a igual concentración que en el gel inferior), se vertió sobre el gel de separación -del que previamente se había retirado el agua o isopropanol- y se colocó un peine formador de pocillos, dejando polimerizar durante 45 minutos. Una vez terminada la polimerización se retiró el peine quedando en el gel de concentración 15 pocillos de 7 mm.

El gel se montó en un equipo de electroforesis vertical

Protean II slab cell (BIO RAD Laboratories, Richmond, California, USA).

En el caso de realizarse a continuación de la separación electroforética una tinción con azul coloidal G o inmunoblotting, cada pocillo se cargó con 20 µg de proteínas disueltas en tampón de muestra; en el caso de realizar una tinción de plata posterior a la separación, la cantidad de proteínas puesta en cada pocillo fué de 5 µg. Previamente las muestras se sometieron a un calentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido de centrifugación a 11000 r.p.m. durante 5 minutos en microfuga (HERMLE Z 231 M). Para estimación de pesos moleculares y como control de la electroforesis se cargó un pocillo con un patrón de pesos moleculares (BIO RAD) bien de bajo peso molecular (fosforilasa b, 97.4 Kdal; seroalbúmina bovina, 66.2 Kdal; ovoalbúmina, 45 Kdal; anhidrasa carbónica bovina, 31 Kdal; inhibidor tripsínico de la soja, 21.5 Kdal y lisozima, 14.4 Kdal) o alto peso molecular (miosina, 200 Kdal; galactosidas de *E. coli*, 116.25 Kdal; fosforilasa b; seroalbúmina bovina y ovoalbúmina).

La electroforesis se realizó, según recomendación del fabricante, a intensidad constante de 25 mA en el gel de

concentración y 35 mA en el gel de separación durante 4 horas. Durante la electroforesis se evitó el calentamiento por medio de un sistema de circulación de agua incorporado en el propio equipo de electroforesis.

Como tampón para la electroforesis se usó 0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glicina y SDS 0.1% p/v.

La preparación de los distintos geles se detalla a continuación:

Gel de separación con concentración de poliacrilamida del 12.5%

	Gel de separación	Gel concentración
Acril/Bis (%) Conc. Tris, pH	12.5% 0.378M, pH 8.8	3% 0.125M, pH 6.8
Acril/Bis (30%)	16.6 ml	1 ml
Tris 1.5M pH 8.8	10 ml	
Tris 0.5M pH 6.8		2.5 ml
SDS (10%)	400 μ l	100 μ l
Agua destilada	12.8 ml	6.4 ml

Desgasificar 15 minutos y añadir

Persulfato amónico (10%)	200 μ l	50 μ l
TEMED	60 μ l	15 μ l

Gel de separación con concentración de poliacrilamida del 7.5%

Gel separación Gel concentración

Acril/Bis (%) Conc. Tris, pH	7.5% 0.378M, pH 8.8	3% 0.125M, pH 6.8
Acril/Bis (30%)	10 ml	1 ml
Tris 1.5M pH 8.8	10 ml	
Tris 0.5M pH 6.8		2.5 ml
SDS (10%)	400 μ l	100 μ l
Agua destilada	19.3 ml	6.4 ml

Desgasificar 15 minutos y añadir

Persulfato amónico (10%)	200 μ l	50 μ l
TEMED	60 μ l	15 μ l

Gel de separación en gradiente lineal (7.5%-15%)

	Gel separación	Gel concentración
Acril/Bis (%) Conc. Tris, pH	7.5%----15% 0.375M pH 8.8	3% 0.125M pH 6.8
Acril/Bis (30%)	4.35 ml 8.75 ml	1 ml
Tris 1.5M pH 8.8	4.37 ml 4.37 ml	
Tris 0.5M pH 6.8		2.5 ml
SDS (10%)	175 μ l 175 μ l	100 μ l
Agua destilada	8.45 ml 4.05 ml	6.4 ml

Desgasificar 15 minutos y añadir

Persulfato amónico (10%)	87 μ l 87 μ l	50 μ l
TEMED	26 μ l 26 μ l	15 μ l

4.2.-TINCION DE PROTEINAS EN GELES

Una vez separadas las proteínas en el gel se tiñeron con azul brillante G, o en su caso se realizó una tinción con álcali-plata (OAKLEY et al., 1980).

4.2.1-TINCION CON AZUL BRILLANTE G

Una vez separadas las proteínas en el gel se fijan durante 1 hora en una solución con 7% v/v de ácido acético glacial y 40% v/v de metanol. Transcurrido este tiempo el gel se introdujo en una solución colorante (SIGMA) a la que se había adicionado metanol (4 partes de solución colorante y 1 parte de metanol), dejando el gel en esta solución durante 2 horas. Se destiñó seguidamente con 10% v/v de ácido acético glacial y 25% v/v de metanol durante 60 segundos, lavando el gel a continuación con metanol al 25% v/v y dejando el gel en éste durante 24 horas.

4.2.2.-TINCION ALCALI-PLATA

Por su mayor sensibilidad se tiñeron algunos

extractos antigénicos separados previamente por SDS-PAGE, por la técnica descrita por OAKLEY et al. (1980). Una vez separadas las proteínas en el gel, se realizó su fijación sumergiendo éste en tres soluciones fijadoras, en las que se dejó durante 20 minutos en cada una de ellas (50% metanol y 7.5% ácido acético; 5% metanol y 7.5% ácido acético; glutaraldehído al 10%). Seguidamente se realizaron varios lavados con grandes volúmenes de agua destilada, dejándose el gel durante toda la noche en aproximadamente dos litros de agua destilada. Al día siguiente se realizó la tinción con una solución de álcali-plata (4 ml de AgNO_3 al 20% añadidos lentamente a la vez que 21 ml de NaOH al 0.36% + 1.4 ml de H_3N sobre 73.6 ml de agua destilada en agitación) durante 15 minutos o menos tiempo si el gel oscurecía. El revelado se efectuó, después de realizar dos lavados de 15 minutos cada uno de ellos con agua destilada, con una solución que contenía 5 microlitros de formol al 38% por cada ml de ácido cítrico al 0.05% durante 10 minutos. El revelado se detuvo con ácido acético al 18% durante 5 - 10 minutos, lavándose seguidamente varias veces con grandes volúmenes de agua destilada.

4.3.-CONSERVACION DE GELES

Una vez teñidas las proteínas separadas en los geles, se colocaron entre 2 láminas de celofán poroso (BIO RAD) o bien entre una lámina superior de celofán y otra inferior de papel de filtro. El gel y celofán se humedecieron previamente en una solución con 3% v/v de glicerol, 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético glacial. Si se empleó papel de filtro este sería humedecido con agua destilada. La desecación, según instrucciones del fabricante, se realizó a 80°C durante 2 horas con empleo de vacío (aproximadamente 175 mm Hg) en un secador de geles modelo 543 (BIO RAD).

Los geles teñidos pueden permanecer estables durante varias semanas sumergidos en una solución al 25% p/v de sulfato amónico.

III.5.-INMUNOBLOTTING

5.1.-DESCRIPCION DE LA TECNICA

Se ha realizado por una modificación del método

descrito por TOWBIN et al. (1979)

Para lograr la electrotransferencia de proteínas de alto peso molecular (Yop1) ha sido necesario el empleo de geles en gradiente lineal (descritos anteriormente) así como la adición al tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v de metanol, pH 8.3) de 0.1% p/v de SDS.

Una vez realizada la separación de proteínas en el gel, se introdujo éste en tampón de transferencia durante media hora a temperatura ambiente. Seguidamente se colocó sobre el gel el papel de nitrocelulosa de 0.42 μm de tamaño de poro (BIO RAD), previamente humedecido con tampón de transferencia y sobre el cual iban a ser transferidas las proteínas. Nitrocelulosa y gel se envolvieron entre dos láminas de papel de filtro 3 MM (BIO RAD) también humedecidas en tampón, eliminandose a continuación las posibles burbujas de aire retenidas rodando un tubo de ensayo. El sandwich se puso entre dos hojas de fibra porosa (Scotch-Brite) prehumedecidas con tampón de transferencia. El sandwich completo se colocó en un soporte de paredes agujereadas y éste se llevó a una cubeta de electrotransferencia (TRANS BLOT CELL. BIO

RAD) de modo que el gel quedase orientado hacia el cátodo. La cubeta se llenó de tampón hasta cubrir el gel y se conectó a la fuente de alimentación. La transferencia se realizó a 1 A durante una hora estando los electrodos separados una distancia de 4 cm. Durante el proceso de transferencia se evitó el calentamiento mediante el empleo de un serpentín de aluminio (BIO RAD) enfriado a 4°C y conectado a un sistema de corriente de agua.

Acabada la electrotransferencia se descartó el gel y se cortó el papel de nitrocelulosa de modo que una tira contuviese el patrón de pesos moleculares y una muestra de cada extracto antigénico a ensayar que se tiñeron con negro amido y el resto de tiras contendrían los extractos antigénicos sobre los que se realizaría la inmunodetección.

5.2.-TINCION DE PROTEINAS EN PAPEL DE NITROCELULOSA

Para control de la electrotransferencia y para la estimación de los pesos moleculares de la bandas proteicas en cada transferencia se realizó una tinción con negro amido (TOWBIN et al., 1979). El papel se introdujo de 3 a 5 minutos en una solución

colorante compuesta de 0.1% p/v Negro Amido (SIGMA) en 45% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético glacial. La decoloración se realizó con una solución decolorante compuesta por 70% v/v de metanol y 7% v/v de acético glacial durante 15 minutos lavándose seguidamente con agua destilada y secándose con ayuda de papel de filtro.

III.6.-INMUNODETECCION

A las tiras de papel de nitrocelulosa sobre las que se habían transferido las bandas proteicas separadas en el gel, se le hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS adicionado de 0.1% v/v Tween 20 y seguidamente, se procedió al bloqueo de las zonas del papel no ocupadas por antígeno. El bloqueo se consiguió mediante su incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en solución bloqueante (PBS adicionado de 0.1% v/v Tween 20 y 3% p/v de gelatina). Después de realizar tres lavados iguales a los descritos anteriormente, se realizó una incubación durante 4 horas a temperatura ambiente con suero diluido 1:100 en solución diluyente (PBS adicionado de 0.05% v/v Tween 20, 0.25% p/v gelatina y 1% v/v suero fetal de ternera (SIGMA)). En el caso de emplear suero de inmunización intraperitoneal, después de realizar nuevos lavados se

incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con anti-Ig G marcada con peroxidasa diluido (SIGMA) 1:500 en solución diluyente (PBS adicionado de 0.25% v/v Tween 20, 0.25% p/v gelatina y 10% suero de conejo). En el caso de sueros de inmunización oral se utilizó un sistema de anti-inmunoglobulina (Ig G, Ig M o Ig A) marcada con biotina (SIGMA) diluida 1:400 en solución diluyente (PBS adicionado de 0.05% v/v Tween 20, 0.25% p/v gelatina y 10% de suero de cabra) y avidina unida a peroxidasa (SIGMA) diluida 1:500 en PBS adicionado de 0.05 Tween 20 y 0.25% p/v de gelatina.

Como cromógeno para detectar anticuerpos unidos específicamente a proteínas se usó 4-Cloro,1-Naftol (SIGMA) al 0.05% p/v en 20% v/v metanol y 0.015% v/v de agua oxigenada al 30% en PBS de acuerdo con el método de HAWKES et al. (1982).

III.7.-ESTIMACION DE PESOS MOLECULARES

Las movilidades relativas (Rf) de las proteínas separadas por SDS-PAGE son función lineal de los logaritmos de sus pesos moleculares (SHAPIRO et al., 1967; WEBER y OSBORN, 1969). En base a esto y utilizando un patrón de pesos moleculares se pueden

determinar los pesos moleculares de las bandas separadas en el gel. Determinando los Rf de las proteínas del patrón, con peso molecular conocido, se puede representar una recta patrón de los logaritmos de pesos moleculares en función de sus movilidades relativas. Seguidamente tomando como base esta recta y calculando el Rf de cada banda proteica de los extractos antigénicos nos permitió calcular el correspondiente peso molecular.

III.8.-CULTIVO DE PRECURSORES DE MACROFAGOS-GRANULOCITOS

La proliferación "in vitro" de precursores de macrófagos y granulocitos se determinó por medio del cultivo de células de médula ósea en medio semisólido de agarosa (METCALF, 1977). Como fuente suministradora de factor estimulador de colonias (CSF), se emplearon los sueros de animales infectados con la cepa IP383 e IP383p- y sacrificados a los 5 días de la infección (sueros V y VI).

8.1.-MEDIO DE CULTIVO PARA CELULAS DE MEDULA OSEA (METCALF, 1977)

Se ha utilizado medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado

con 15% FCS (SIGMA), 1% v/v antibiótico-antimicótico (SIGMA), piruvato (SIGMA) 1 mM y 0.2% p/v de bicarbonato sódico (SIGMA) y con 0.3% p/v de agarosa (SIGMA) de bajo punto de gelificación como solidificante. Ambos medios, se prepararon a concentración 2X, manteniéndose la agarosa a sobrefusión en baño maría a 38°C, y el RPMI 1640 se mantuvo también a igual temperatura, mezclándose agarosa y medio líquido antes de su empleo.

Medio RPMI 1640 suplementado 2X

RPMI 1640	0.52 g
Antibiótico-antimicótico	0.5 ml
Piruvato	0.5 ml
Bicarbonato sódico	0.1 g
FCS	7.5 ml
Agua destilada	25 ml

Preparación: se disuelve el RPMI 1640 en agua destilada, añadiendo a continuación el resto de componentes y filtrándose seguidamente con empleo de una bomba peristáltica de presión positiva, utilizando filtros Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro.

El medio se mantiene a 38°C en baño maría hasta su uso.

Agarosa 2X

Agarosa de bajo punto de gelificación	0.17 g
Agua destilada	25 ml

Preparación: se resuspende la agarosa en agua destilada y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos, manteniéndose posteriormente a sobrefusión en baño maría a 38°C.

8.2.-OBTENCION DE CELULAS DE MEDULA OSEA

Las células de médula ósea se obtuvieron de femures de ratones sanos BALB/c. Una vez muerto el animal por dislocación cervical, se procedió a la extracción del fémur en condiciones de asepsia y trabajando en cabina de flujo laminar. Conseguido el fémur, se desrotuló y se hizo pasar a través de él 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% v/v de suero fetal de ternera (FCS) utilizando una jeringa de insulina, recogiendo las células arrastradas por el medio en un tubo de centrifuga estéril.

Seguidamente se procedió al recuento de células viables en cámara de Neubauer por el método de exclusión con azul tripán, y ajustándose a continuación la suspensión celular a una concentración de 10^6 células/ml.

8.3.-CULTIVO DE CELULAS DE MEDULA OSEA

Para el cultivo se emplearon placas estériles de 12 pocillos (COSTAR), poniéndose en cada uno de los pocillos: 0.1 ml de la suspensión celular (10^5 células), 0.1 ml de suero (sueros V o VI o suero control positivo) y 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado y adicionado de 0.3% de agarosa mantenido a sobrefusión en baño maría a 38°C . Una vez adicionados todos los componentes, el cultivo se llevó a nevera durante 5 minutos con objeto de facilitar la gelificación del medio, y seguidamente se incubó en atmósfera húmeda a 37°C y con un 5% de CO_2 . Transcurridos 7 días, se procedió al recuento de colonia (CFU) en microscopio invertido, considerando colonias aquellas agrupaciones celulares de más de 50 elementos.

III.9.-DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES

9.1.-OBTENCION DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES

El procedimiento empleado para la consecución de inmunocomplejos presentes en suero está basado en su precipitación mediante polietilenglicol 6000 (PEG 6000) (DIGEON et al., 1977).

Se tomaron 150 μ l de los sueros V y VI y se llevaron a sendos eppendorf de 1.5 ml, añadiéndose a continuación 36 μ l de PEG al 20% (p/v), 18 μ l de EDTA 0.2 M y 6 μ l de PBS. La mezcla, se agitó y se incubó a 4°C durante 18 horas. Transcurrida esta incubación, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C en una microfuga HERMLE Z 231 M. El precipitado obtenido, se lavó por centrifugación (de igual manera a la anterior) 2 veces con PEG al 2% (p/v), resuspendiendo el sedimento resultante en 50 μ l de tampón de muestra para SDS-PAGE, conservándose en éste a -20°C.

9.2.-DETECCION DE PROTEINAS INTEGRANTES DE INMUNOCOMPLEJOS

Los inmunocomplejos recogidos en tampón para SDS-PAGE, se

sometieron a una separación electroforética con empleo de geles en gradiente lineal (concentración de poliacrilamida del 7.5 al 15%), de igual modo al descrito en el apartado 4.1. Cada pocillo se cargo con 20 µl de tampón de muestra conteniendo los inmunocomplejos, previo calentamiento a 95°C durante 5 minutos y posterior centrifugación en microfuga. Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa e inmunodetección del mismo modo al descrito en los apartados 5.1 y III.6. Para la detección de las proteínas en el papel, se empleó suero procedete de animales inmunizados con la cepa IP383 via intraperitoneal (suero I), empleando anti-IgG-biotina y Avidina peroxidasa como sistema de revelado.

RESULTADOS

IV.1.- ANALISIS DE EXTRACTOS PROTEICOS POR SDS-PAGE.

1.1.-PROTEINAS TOTALES DE ENVUELTAS

El análisis de proteínas totales de envueltas celulares se planteó como una primera aproximación a la aplicación de la técnica de SDS-PAGE al estudio de proteínas superficiales de *Y. enterocolitica*. Además, el conocimiento de los perfiles así obtenidos es un paso previo a su utilización como antígenos en inmunoblotting con el fin de investigar las posibles respuestas a proteínas codificadas por el plásmido de virulencia, no ubicadas en la membrana externa.

Las primeras experiencias se realizaron en geles de composición constante (12.5 % de poliacrilamida), que permiten caracterizar bandas correspondientes a polipéptidos comprendidos entre 100 y 14 kdal (Instrucciones técnicas de Bio Rad). Las envueltas procedían de bacterias cultivadas en medio BHI suplementado con glucosa y $MgSO_4$. En la Fig. 1 se presentan perfiles obtenidos en estas condiciones. La mayor densidad de bandas aparece claramente por encima de 25 kd. Una rápida comparación de los perfiles

permite detectar una banda de alto peso molecular (que apenas penetra en el gel) en el correspondiente a la cepa IP383 crecida a 37°C (carril a); esta banda está ausente en la misma cepa crecida a 25°C y en la cepa isogénica sin plásmido, IP383p-, a 37°C y a 25°C (carriles c, b y d), y por su posición debe identificarse con Yop1, si bien su caracterización correcta por su peso molecular no puede efectuarse en estas condiciones (se requiere un gel de menor concentración de poliacrilamida). Un análisis más detallado revela algunas diferencias menores. Además, IP383 a 37°C presenta una banda difusa de aproximadamente 25 kdal que no aparece en los restantes carriles, y que por su peso molecular se corresponde con Yop5.

La mejor caracterización de Yop1 y otras bandas de elevados pesos moleculares planteó la necesidad de usar geles en gradiente. Como se muestra en la Fig. 2, el desarrollo electroforético en estas condiciones (de 7.5 % a 15 % de poliacrilamida) reveló claras diferencias entre los perfiles; así en el carril correspondiente a la cepa IP383 crecida a 37°C (carril a) aparecen bandas proteicas de alto peso molecular (superior al estándar de mayor peso) 49 Kdal, 41 Kdal, 37 Kdal y 25 Kdal que no aparecen en los extractos obtenidos

RESULTADOS

a 25°C a partir de la misma cepa ni en aquellos procedentes de la cepa IP383p- a 25°C o 37°C (carriles c, d, b).

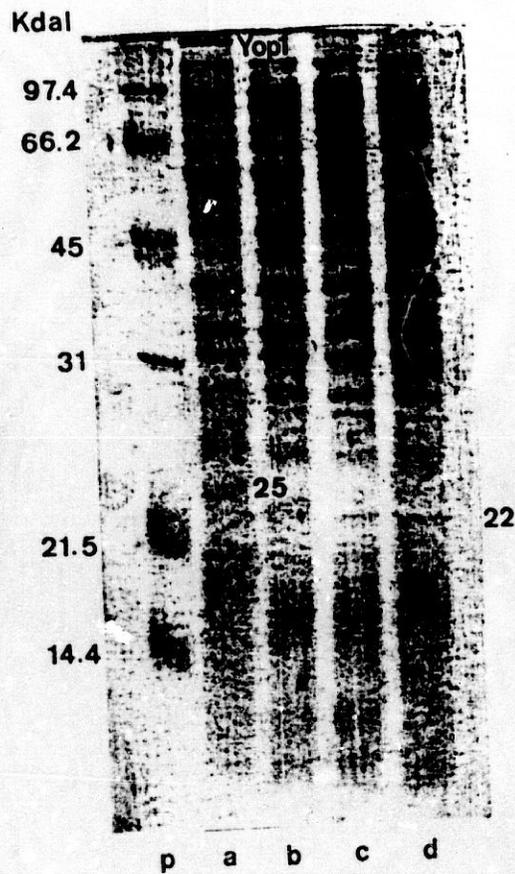


Fig. 1. SDS-PAGE en gel del 12.5%. Proteínas de envueltas totales. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°C; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C; p: patrón de pesos moleculares.

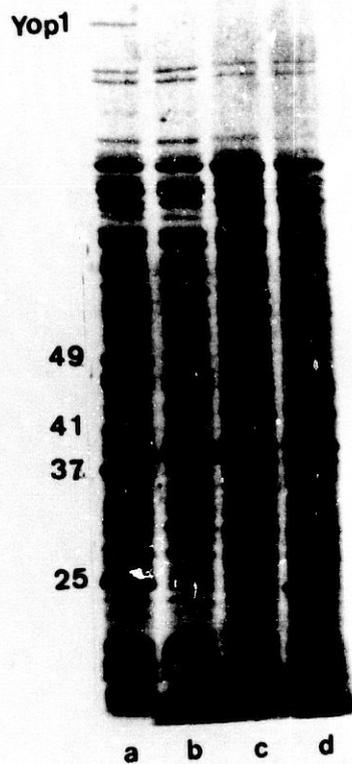


Fig. 2. SDS-PAGE en gel en gradiente lineal. Proteínas de envueltas totales. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C.

1.2.- OMPs

1.2.1.-INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO

Para la identificación de aquellas proteínas presentes en la membrana externa es necesario la eliminación de aquellas localizadas en la membrana interna. En el presente estudio se compararon dos métodos de solubilización de proteínas de membrana interna: en uno de ellos se utilizó Sarkosyl (FILIP et al., 1973) y en el otro Tritón X-100 (SCHNAITMAN, 1971).

Al comparar los perfiles de OMPs obtenidos por tratamiento con Tritón X-100 (Fig. 3) con los correspondientes obtenidos por tratamiento con Sarkosyl (Fig. 4) se observa como en el primero de ellos aparece un elevado número de bandas proteicas no presentes cuando el enriquecimiento en OMPs se realiza con Sarkosyl. En los extractos proteicos tratados con Tritón X-100, pueden apreciarse bandas con pesos moleculares > 98 Kdal y 23 Kdal, sólo presentes en el carril correspondiente a la cepa IP383 crecida a 37°C (Fig. 3, carril a) no apareciendo en aquellos obtenidos a partir de la cepa IP383p- a 37°C o 25°C y cepa IP383 a 25°C (carriles b, c y d). Más claros

aparecen los perfiles obtenidos mediante el empleo de Sarkosyl, donde pueden apreciarse con mayor nitidez OMPs codificadas por el plásmido a 37°C (sólo están presentes en el carril a que corresponde a la cepa virulenta crecida a 37°C) con pesos moleculares > 98 Kdal y 25 Kdal; estos polipéptidos corresponderían a Yop1, y Yop5 (KAPPERUD et al., 1985^b; BOLIN et al., 1985). En cuanto a polipéptidos cromosómicos presentes en la membrana externa se destacan seis con pesos moleculares de 84, 64, 48, 45, 35 y 30 Kdal (Fig. 4, carriles a, b, c y d). A la vista de los resultados obtenidos, se eligió el tratamiento con Sarkosyl para las ulteriores experiencias.

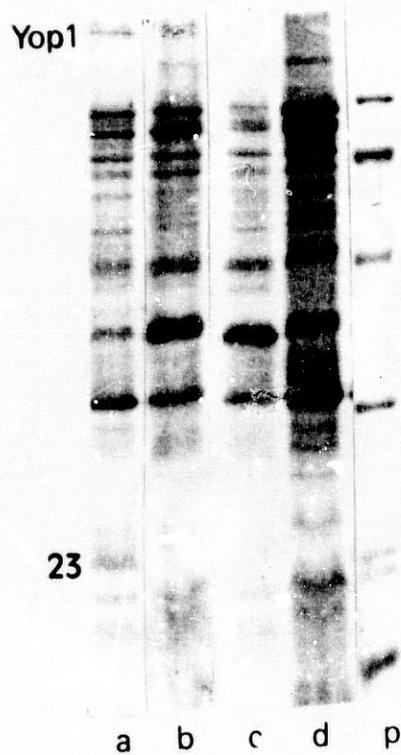


Fig. 3. SDS-PAGE en gel del 12.5%. OMPs obtenidas por tratamiento con Tritón X-100. Carril **a:** IP383 crecida a 37°C; carril **b:** IP383p- crecida a 37°C; carril **c:** IP383 crecida a 25°C; carril **d:** IP383p- crecida a 25°C; **p:** patrón de pesos moleculares.

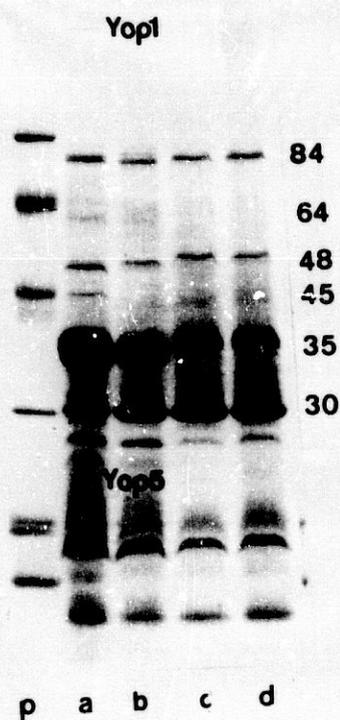


Fig. 4. SDS-PAGE en gel en gradiente lineal. OMPs obtenidas por tratamiento con Sarkosyl. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C; **p**: patrón de pesos moleculares.

1.2.2.-INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo ejerce una decisiva influencia tanto en los patrones de OMPs tanto cromosómicas como plásmidicas (SKURNIK, 1985). Se ha analizado la influencia que en este sentido ejercen los medios BHI suplementado con $MgSO_4$ y glucosa, RPMI 1640 y RPMI 1640 suplementado con HEPES sobre la expresión de proteínas de membrana externa a 37°C. En el perfil correspondiente a OMPs de la cepa IP383 crecida a 37°C en RPMI 1640 se observa la aparición inmediatamente debajo de Yop1 de otras proteínas de elevado peso molecular (mayor a 100 Kdal) (Fig. 5, carril a) que no aparecen en la cepa IP383p- (carril c) lo que indica que están codificadas por el plásmido de virulencia. Estas bandas acompañantes de Yop1 no aparecen en el perfil de la misma cepa crecida en BHI suplementado (carril b). Para conseguir una adecuada caracterización de los polipéptidos correspondientes a estas bandas, se recurrió al empleo de un gel del 7.5% que al incrementar las separaciones facilitó la determinación de los respectivos pesos moleculares. Así, se pudo establecer que junto a Yop1 cuyo peso molecular se estableció en 190 Kdal aparecieron cuatro bandas de 170, 118, 100 y 98 kdal (Fig. 6).

Prosiguiendo el análisis de las diferencias observadas entre los perfiles obtenidos en RPMI 1640 y BHI suplementado, es de destacar que la expresión de Yop5 se ve reprimida (al menos parcialmente) cuando la cepa IP383 crece en RPMI 1640: en efecto, la banda de 25 kdal, que se observa nitidamente en el perfil de IP383 crecida en BHI suplementado (carril b de la Fig. 5) no aparece en el perfil correspondiente al RPMI 1640 (carril a). Sin embargo, cuando las OMPs de IP383 crecida en RPMI 1640 se analizan en un gel en gradiente, es posible apreciar una débil coloración en la posición de 25 kdal (Fig. 7, carril a), que podría atribuirse a la presencia de pequeñas cantidades de la proteína en cuestión. Otra diferencia observable en la expresión de OMPs plasmídicas en estos dos medios se encontró en la aparición de un polipéptido de 49 Kdal sólo en RPMI 1640 (Fig. 7, carril a) pero no en BHI suplementado (Fig. 4, carril a). Este polipéptido podría tratarse de Yop2 (BOLIN et al., 1985) o bien de monómeros de Yop1 (SKURNIK et al., 1984; ZALESKA et al., 1985).

La influencia del medio de cultivo se extiende también a la expresión de OMPs codificadas por el cromosoma. En la Fig. 5 se observa que tanto la cepa IP383 como la IP383p⁻, crecidas en RPMI

1640, expresaron sendas OMPs de 74 y 66 kdal (carriles a y c), ausentes en los perfiles procedentes de BHI suplementado (carriles b y d).

En experimentos no relacionados con los aquí expuestos, se ha encontrado que las variaciones del pH consecuencia del crecimiento de *Y. enterocolitica* en medios de cultivo de tejidos ejerce una importante influencia en el comportamiento de la bacteria (resultados no publicados). Esto nos llevó a comparar la expresión de OMPs en cultivos crecidos en RPMI 1640 y en el mismo medio adicionado de HEPES. En la Fig. 7 se muestran los resultados de un experimento de este tipo, realizado en gel en gradiente de poliacrilamida. El simple hecho de tamponar el medio determinó una disminución en la expresión de Yop1 y la desaparición de Yop2 (la banda de 49 kdal presente en el carril a no se detecta en el b). Además, se aprecia una disminución en el número de bandas localizadas en la región comprendida entre Yop1 y 98 kdal.

La comparación de los perfiles obtenidos en distintos medios de cultivo suministró una base para la elección del medio a utilizar en las ulteriores experiencias. El hecho de que en RPMI 1640 se

reprime la expresión de Yop5, unido al pobre rendimiento de masa bacteriana obtenido en este medio, decantó la elección hacia el medio BHI suplementado con $MgSO_4$ y glucosa. No obstante, dada la superproducción de Yop1 en RPMI 1640 (Fig. 5, carril a) se recurrió al uso de este medio para la caracterización del monómero de Yop1 (SKURNIK et al., 1984). El calentamiento de OMPs en exceso de 2-mercaptoetanol permitió la reducción de Yop1 a formas monoméricas que aparecieron con un peso molecular de 49 Kdal (Fig. 8, carril a).

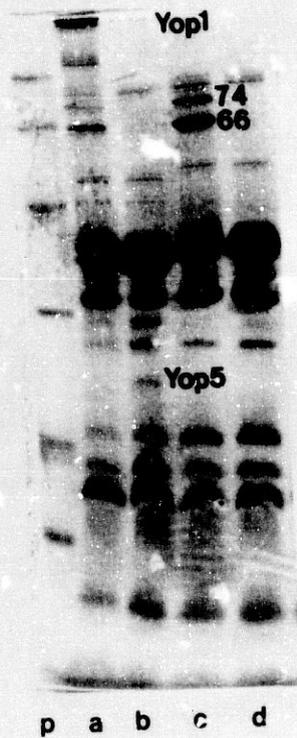


Fig. 5. SDS-PAGE 12.5%. OMPs obtenidas por tratamiento con SarKosyl. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C en RPMI 1640; carril **b**: IP383 crecida a 37°C en BHI suplementado; carril **c**: IP383p- crecida a 37°C en RPMI 1640; carril **d**: IP383p- crecida en BHI suplementado; **p**: patrón de pesos moleculares.

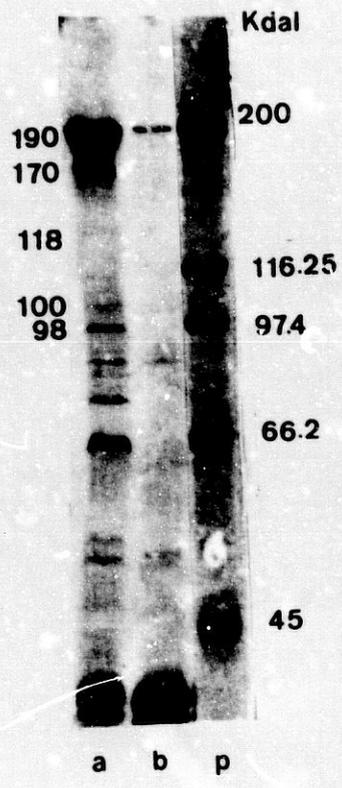


Fig. 6. SDS-PAGE en gel del 7.5%. Carril **a**: OMPs de IP383 crecida a 37°C en RPMI 1640; carril **b**: OMPs de IP383 crecida a 37°C en BHI suplementado; **p**: patrón de pesos moleculares.

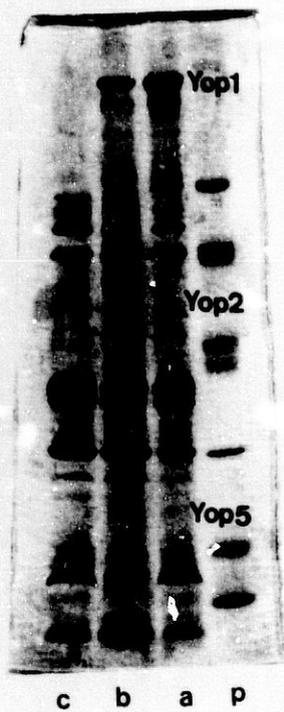


Fig. 7. SDS-PAGE de OMPs en gel en gradiente lineal. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C en RPMI 1640; carril **b**: IP383 crecida a 37°C en RPMI 1640 suplementado con HEPES; carril **c**: IP383p- crecida a 37°C en RPMI 1640; **p**: patrón de pesos moleculares.



Fig. 8. SDS-PAGE en gel en gradiente lineal. OMPs calentadas en exceso de 2-mercaptoetanol. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; **p**: patrón de pesos moleculares.

1.2.3.-ANÁLISIS DE OMPs REVELADAS POR TINCIÓN DE ALCALI-PLATA

Dada su alta sensibilidad, se recurrió a la tinción de álcali-plata para el análisis en detalle de las OMPs obtenidas por tratamiento con Sarkosyl a partir de bacterias crecidas en BHI suplementado y desarrolladas en gel en gradiente. En los perfiles obtenidos (Fig. 9) se corroboró la presencia de Yop1 y Yop5, viéndose confirmado el peso molecular determinado previamente para esta última (carril a). La confirmación del peso dado para Yop1 requirió el uso de un gel del 7.5% de poliacrilamida, encontrándose que el crecimiento en BHI suplementado no modificó este parámetro (Fig. 10). La tinción de álcali-plata no permitió detectar en la cepa IP383 crecida en BHI suplementado ninguna de las bandas de pesos moleculares comprendidos entre Yop1 y 98 Kdal (Fig. 9 y Fig. 10), que se observaron cuando esta cepa creció en RPMI 1640 a 37°C (Fig. 5 y Fig. 6). Dada la gran sensibilidad de la tinción, debe interpretarse que la síntesis de los correspondientes polipéptidos esta reprimida o es mínima en el medio BHI suplementado. Además, en los perfiles de la cepa IP383 a 37°C (Fig. 9, carril a) apareció una banda localizada a 28 Kdal, inmediatamente debajo de un polipéptido cromosómico de alrededor 30 Kdal, fácilmente detectable con la tinción menos

sensible de azul coloidal. Esta banda de 28 Kdal, solo observable mediante la tinción de álcali-plata (y como se indicará mas adelante, con el revelado por inmunoblotting) debería corresponder a un polipéptido codificado por el plásmido, no descrito hasta la fecha, y que por tanto debe considerarse como una nueva Yop del serogrupo 0:9.

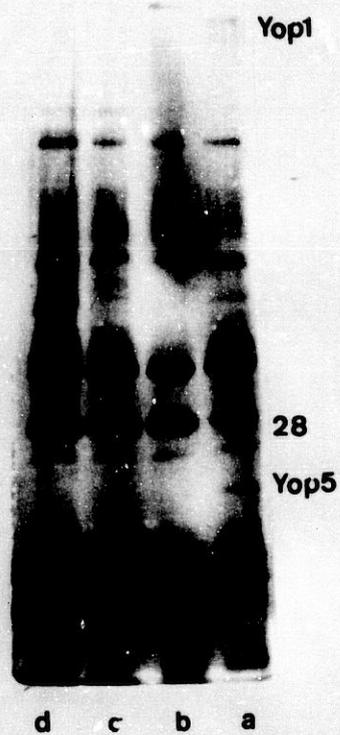


Fig. 9. SDS-PAGE en gel en gradiente lineal. OMPs teñidas con álcali-plata. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C;

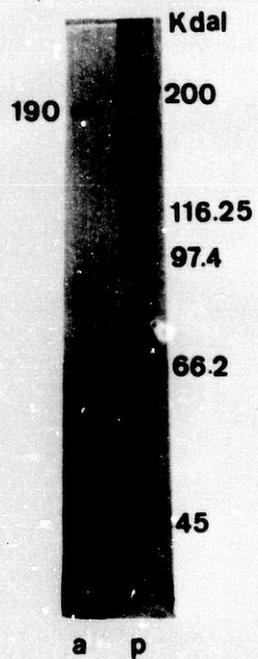


Fig. 10. SDS-PAGE en gel del 7.5%. Tinción álcali-plata. Carril **a**: OMPs de IP383 crecida a 37°C; carril **p**: patrón de pesos moleculares.

1.2.4.-INFLUENCIA DE LA DELIPIDACION POR EL METODO DE GALANOS

El tratamiento (previo a la solubilización de proteínas de membrana interna por Sarkosyl) de proteínas totales de envueltas por la técnica de Galanos, como método de delipidación, tuvo como consecuencia una pérdida parcial de determinadas proteínas (Yop1), así como una aparente disminución en la solubilización de proteínas de membrana interna, ya que aparecen bandas detectadas en cubiertas totales pero no en perfiles de OMPs (Fig. 11, carril a). La delipidación realizada con posterioridad a la solubilización de proteínas de membrana interna por Sarkosyl, permitió una mayor eliminación de proteínas de membrana interna; además Yop1 se vió poco afectada, aunque sí se apreciaron pérdidas cuantitativamente importantes en Yop5 (Fig. 12, carril a). También se vieron sensiblemente afectadas OMPs cromosómicas de pesos moleculares 84, 48 y 45 Kdal (carriles a, b, c y d).

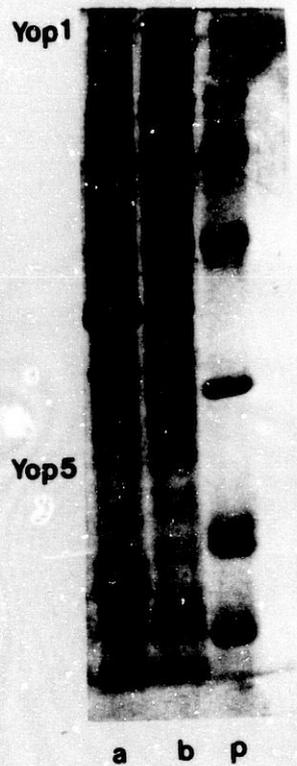


Fig. 11. SDS-PAGE en gel del 12.5%. OMPs de IP383 crecida a 37°C. Carril **a**: tratamiento de envoltas totales con Sarkosyl; carril **b**: delipidación de envoltas totales previa al tratamiento con Sarkosyl; **p**: patrón de pesos moleculares.

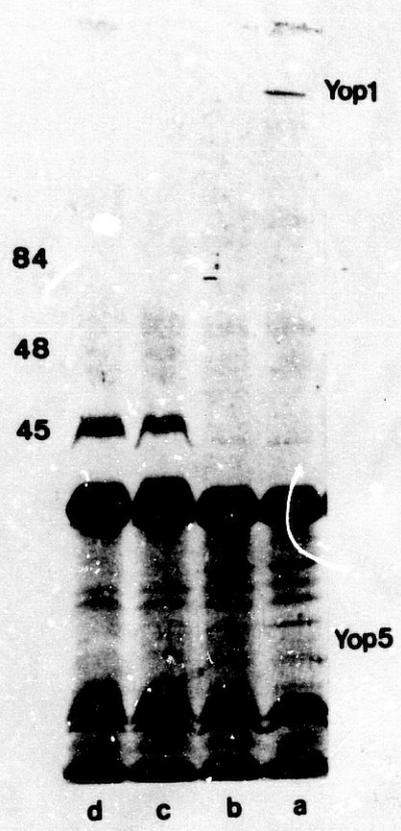


Fig. 12. SDS-PAGE en gel en gradiente lineal. OMPs obtenidas con el empleo de Sarkosyl y posterior delipidación por el método de Galanos. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C.

IV.2.-INMUNOBLOTTING

2.1.-SUEROS OBTENIDOS POR INMUNIZACION INTRAPERITONEAL

2.1.1.-SUERO ANTI IP383 ADSORBIDO CON IP383p- Y ENFRENTADO A PROTEINAS TOTALES

El revelado de las proteínas de envueltas totales con el suero I (obtenido a partir de ratones inmunizados intraperitonealmente) produce una elevada densidad de bandas, debido a que la vía intraperitoneal debe permitir el contacto de todas las fracciones antigénicas. El elevado número de bandas, hace imposible diferenciar aquellas que corresponden a proteínas antigénicas codificadas por el plásmido de virulencia de aquellas que lo son por el cromosóma. Esto hace necesario realizar una adsorción de este suero con la cepa IP383p-, de modo que se retiren los anticuerpos que reconocen fracciones antigénicas comunes a ambas cepas (que serán por tanto codificadas por el cromosóma) y queden solo aquellos específicos para antígenos presentes únicamente en la cepa IP383 (plasmídicos). En la Fig. 13 se muestran los resultados obtenidos en el revelado de proteínas de envueltas totales con suero intraperitoneal adsorbido con la cepa IP383p-. La

elevada eficacia en la adsorción quedó reflejada por la ausencia de bandas frente a la cepa con la que se realizó la adsorción (carriles b y d); frente a la cepa IP383 crecida a 37°C se aprecian bandas de 190, 170, 62, 49, 46, 37-35, 32 y 28 Kdal. Debe resaltarse el hecho de que la banda de 170 Kdal corresponde a uno de los polipéptidos comprendidos entre Yop1 y 98 Kdal, que por tinción de proteínas solo se detectaba en bacterias crecidas en RPMI 1640. La ausencia de estas bandas en los carriles correspondientes a la cepa IP383p-crecida a 37°C (carril b) o a 25°C (carril d) indica que corresponden a proteínas codificadas por el plásmido; el hecho de que no aparecieran bandas frente a OMPs obtenidas a partir de la cepa IP383 crecida a 25°C (carril c) indica que estos polipéptidos sólo se expresan a temperaturas de 37°C.

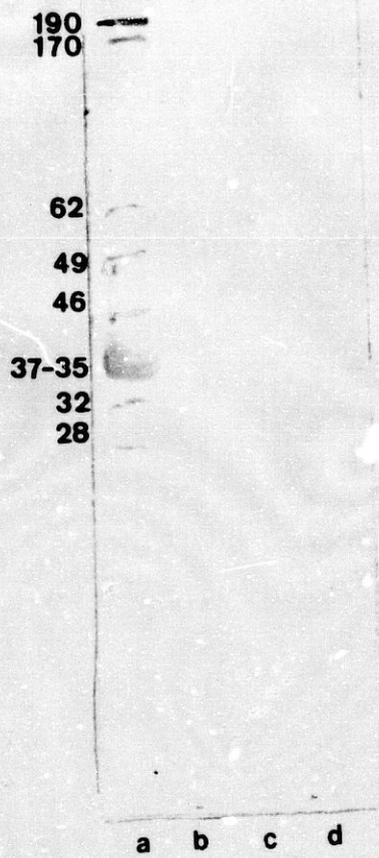


Fig. 13. Inmunoblot del suero I adsorbido con IP383p- enfrentado a proteínas de envueltas totales. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°C; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°.

2.1.2.-SUERO ANTI IP383 ENFRENTADO A OMPs

Para determinar cuales de los anteriores polipéptidos se encuentran ubicados en la membrana externa es necesario el empleo de antígeno constituido por las fracciones enriquecidas en OMPs. El revelado de estas fracciones con suero I, permitió localizar en el carril correspondiente a OMPs obtenidas a partir de la cepa IP383 crecida a 37°C bandas a nivel de 190 Kdal (Yop1), 170 Kdal y otra de 49 Kdal (Yop2) (Fig. 14, carril a). Ninguna de ellas se detectó en las fracciones enriquecidas en OMPs obtenidas a partir de la propia cepa virulenta crecida a 25°C (carril c) o de la cepa avirulenta crecida a 37°C o 25°C (carriles b y d). Para detectar la posible superposición de OMPs cromosómicas y plasmídicas, se realizó el revelado de estos antígenos con el suero I previamente adsorbido con la cepa IP383p- (Fig. 15); se mantuvieron las bandas de 190, 170 y 49 Kdal, y además apareció una banda intensa de 28 Kdal; esta última coincide con el polipéptido observado en SDS-PAGE teñido con álcali-plata y anteriormente definido como una nueva Yop. No aparece sin embargo la banda a nivel de 25 Kdal, descrita como Yop5 (BOLIN et al., 1985), aunque su presencia sí se observó en SDS-PAGE (Fig. 4 y Fig. 5).

El revelado de OMPs con el suero II (obtenido de animales inmunizados intraperitonealmente con la cepa IP383p-), ratificó estos resultados y confirmó la ausencia de inespecificidades al no ofrecer patrón de reacción frente a los anteriores polipéptidos (Fig. 16).

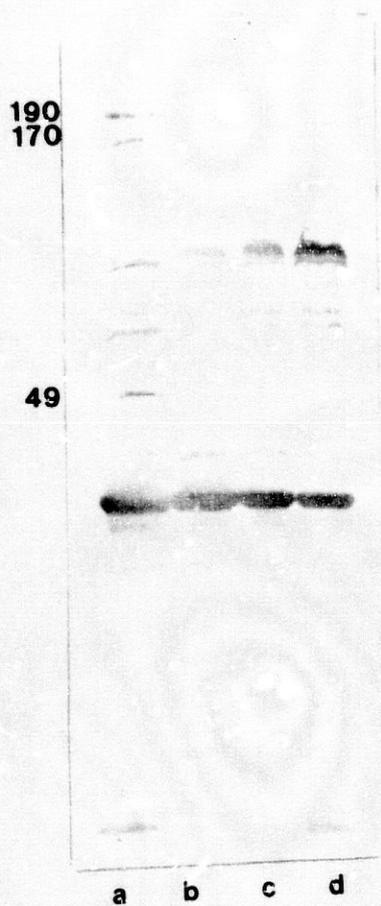


Fig. 14. Inmunoblot del suero I enfrentado a OMPs. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°C; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C.

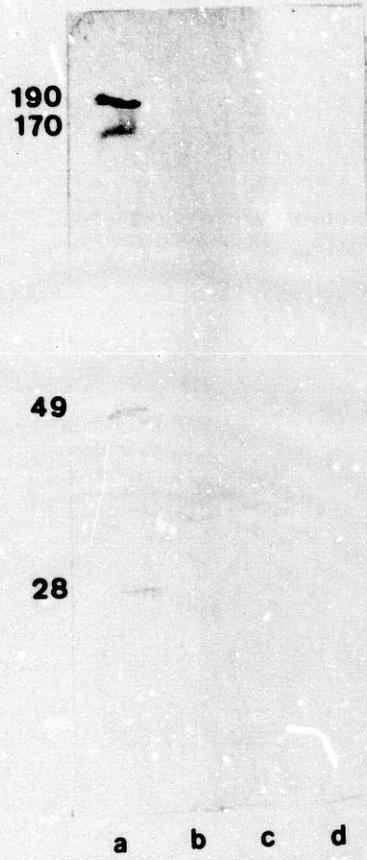
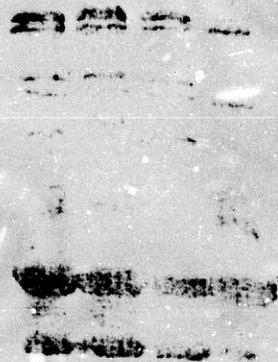


Fig. 15. Inmunoblot del suero I adsorbido con IP383p- enfrentado a OMPs. Carril **a**: IP383 crecida a 37°C; carril **b**: IP383p- crecida a 37°; carril **c**: IP383 crecida a 25°C; carril **d**: IP383p- crecida a 25°C.



a b c d

Fig. 16. Inmunoblot: del suero II enfrentado a OMPs. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p-crecida a 37°; carril: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p-crecida a 25°C.

2.2.-SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS POR VIA ORAL

Se realizaron estudios sobre la cinética de respuesta de IgM, IgG e IgA frente a OMPs en ratones infectados oralmente. Para ello se utilizaron sueros obtenidos a los 2, 5 y 10 días después de la infección. De acuerdo con el diseño general de todas las experiencias incluídas en el presente trabajo, se estudiaron comparativamente sueros de animales infectados con la cepa virulenta IP383 (sueros III, V y VII) y sueros de ratones infectados con el derivado avirulento IP383p- (sueros IV, VI y VIII).

2.2.1.- EVOLUCION DE LA RESPUESTA DE IgM FRENTE A OMPs

A los 2 días después de la infección oral de los ratones (sueros III y IV), no aparece respuesta de IgM frente a OMPs, lo que indica que aún no existen niveles detectables de anticuerpos en suero.

Al realizar el revelado de OMPs de IP383 crecida a 37°C con el suero V (Fig. 17, carril a) apareció una banda débil frente a Yop1, y también una banda frente a Yop5. Estas bandas no se observaron en

los carriles correspondientes a OMPs obtenidas a partir de la cepa IP383p- crecida a 37°C o 25°C (carriles b y d) o de la cepa IP383 crecida a 25°C (carril c). Es suero V dió reacción frente a OMPs cromosómicas, presentes en los extractos proteicos de ambas cepas crecidas tanto a 37°C como a 25°C, y con pesos moleculares de 84, 64, 58, 56 (estas dos últimas no se observaron por tinción de proteínas en SDS-PAGE) y 45 Kdal.

Como era previsible, el suero VI no dió reacción frente a ninguna Yop (Fig. 18, carril a); sin embargo, apareció una respuesta frente a las mismas proteínas cromosómicas que en el caso del suero V, aunque la respuesta fué notablemente más débil, e incluso no llegó a observarse la banda correspondiente al polipéptido de 45 Kdal.

A los 10 días de haber infectado a los ratones, no persistió respuesta de IgM frente a Yop1, pero sí, aunque débil, frente a Yop5, apareciendo una banda a este nivel al revelar OMPs procedentes de la cepa IP383 crecida a 37°C con el suero VII (Fig. 19, carril a). En lo referente a OMPs cromosómicas, se produjo una notable disminución de la respuesta frente a las bandas de 84 y 45 Kdal, y en menor grado

RESULTADOS

los carriles correspondientes a OMPs obtenidas a partir de la cepa IP383p- crecida a 37°C o 25°C (carriles b y d) o de la cepa IP383 crecida a 25°C (carril c). Es suero V dió reacción frente a OMPs cromosómicas, presentes en los extractos proteicos de ambas cepas crecidas tanto a 37°C como a 25°C, y con pesos moleculares de 84, 64, 58, 56 (estas dos últimas no se observaron por tinción de proteínas en SDS-PAGE) y 45 Kdal.

Como era previsible, el suero VI no dió reacción frente a ninguna Yop (Fig. 18, carril a); sin embargo, apareció una respuesta frente a las mismas proteínas cromosómicas que en el caso del suero V, aunque la respuesta fué notablemente más débil, e incluso no llegó a observarse la banda correspondiente al polipéptido de 45 Kdal.

A los 10 días de haber infectado a los ratones, no persistió respuesta de IgM frente a Yop1, pero sí, aunque débil, frente a Yop5, apareciendo una banda a este nivel al revelar OMPs procedentes de la cepa IP383 crecida a 37°C con el suero VII (Fig. 19, carril a). En lo referente a OMPs cromosómicas, se produjo una notable disminución de la respuesta frente a las bandas de 84 y 45 Kdal, y en menor grado

RESULTADOS

frente a las de 64, 58 y 56 Kdal (Fig. 19, carriles a, b, c y d).

Al realizar el revelado con el suero VIII, no apareció respuesta frente a Yops (Fig. 20, carril a). La respuesta frente a OMPs cromosómicas, se encontró limitada al polipéptido de 64 Kdal, no apareciendo respuesta frente a otros polipéptidos (Fig. 20, carriles a, b, c y d).

190

84
64
58
56
45

25

a b c d

Fig. 17. Inmunoblot del suero V enfrentado a OMPs y revelado con anti IgM. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

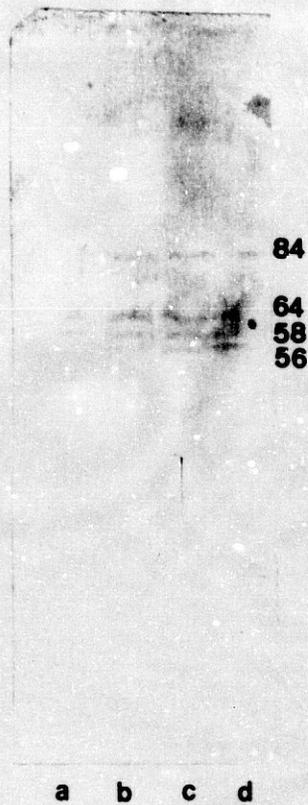


Fig. 18. Inmunoblot. del suero VI enfrentado a OMPs y revelado con anti IgM. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

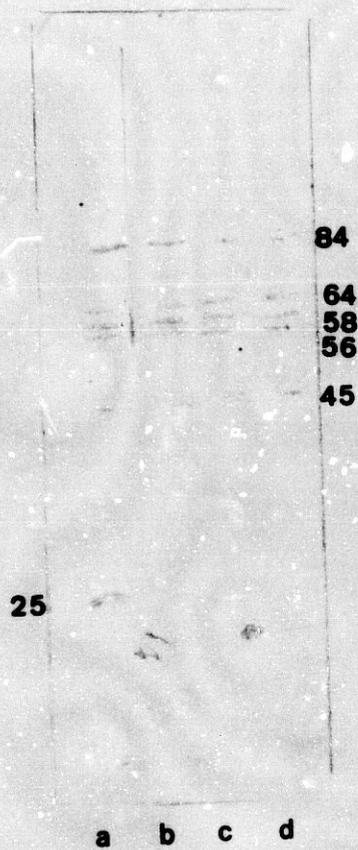


Fig. 19. Inmunoblot del suero VII enfrentado a OMPs y revelado con anti IgM. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.



Fig. 20. Inmunoblot del suero VIII enfrentado a OMPs y revelado con anti IgM. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°C; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

2.2.2.- EVOLUCION DE LA RESPUESTA DE IgG FRENTE A OMPs

A los 2 dias despues de la infecci3n oral (sueros III y IV) no apareci3 respuesta de IgG frente a OMPs cromos3micas ni plasmídicas, an3logamente a lo ocurrido con la respuesta de IgM.

Al revelar OMPs procedentes de la cepa virulenta crecida a 37°C con el suero V, no apareci3 reacci3n frente a ninguna Yop, lo que indica que a los 5 dias de la infecci3n oral no existen niveles detectables de anticuerpos de clase IgG frente a estos polip3ptidos (Fig. 21, carril a). No obstante si se detect3 respuesta de IgG frente a OMPs cromos3micas con pesos moleculares de 84 y 64 Kdal (Fig. 21, carriles a, b, c y d), pero no hubo respuesta frente a los polip3ptidos cromos3micos de 58, 56 y 45 Kdal, frente a los que si se detect3 respuesta de IgM a este tiempo (Fig. 17).

El revelado con el suero VI, no ofreci3 reacci3n alguna frente a Yops (Fig. 22, carril a), y la respuesta frente a OMPs cromos3micas se vi3 sensiblemente disminuida con respecto al suero V, quedando reflejado por la ausencia de la banda de 84 Kdal limitandose la respuesta al polip3ptido de 64 Kdal (Fig. 22, carriles a, b, c y d).

A los 10 días de la infección con la cepa virulenta, apareció una fuerte respuesta frente a Yopl, apareciendo una banda intensa a este nivel al revelar OMPs de la cepa IP383 con el suero VII; también este suero ofreció reacción frente a la OMPs plasmídica de 170 Kdal, y una respuesta mas débil se apreció frente a la nueva Yop de 28 Kdal (Fig. 23, carril a). En lo referente a la respuesta frente a OMPs cromosómicas se produjo una perdida de la respuesta frente al polipéptido de 84 Kdal, manteniendose la banda a nivel de 64 Kdal y apareciendo una banda a nivel de 58 y 35 Kdal (Fig. 23, carriles a, b, c y d).

Como cabia esperar, el suero VIII (procedente de animales infectados con la cepa avirulenta) no reaccionó frente a OMPs plamídicas (Fig. 24, carril a) y la reacción frente a polipéptidos cromosómicos se limitó al de 35 Kdal y mas debilmente frente al de 64 Kdal (Fig. 24, carriles a, b, c y d).



Fig. 21. Inmunoblot del suero V enfrentado a OMPs y revelado con anti IgG. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

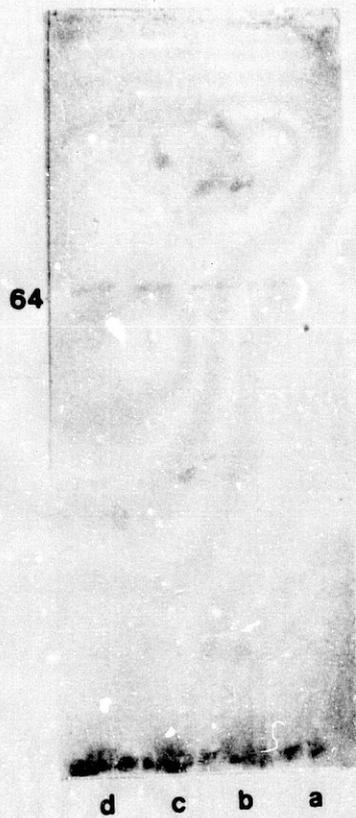


Fig. 22. Inmunoblot del suero VI enfrentado a OMPs y revelado con anti IgG. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

2

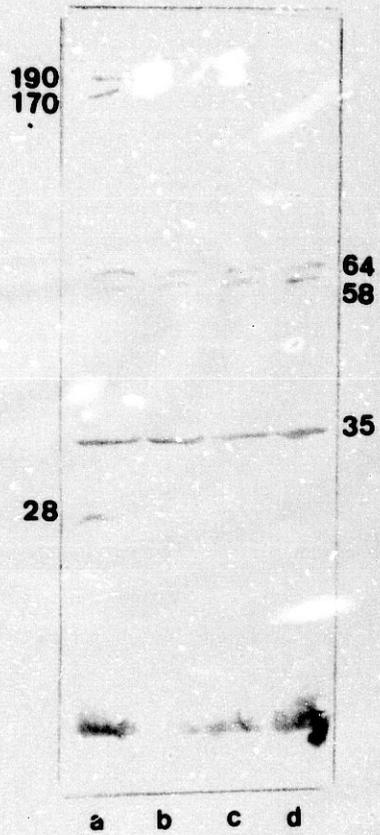


Fig. 23. Inmunoblot del suero VII enfrentado a OMPs y revelado con anti IgG. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carrilc: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

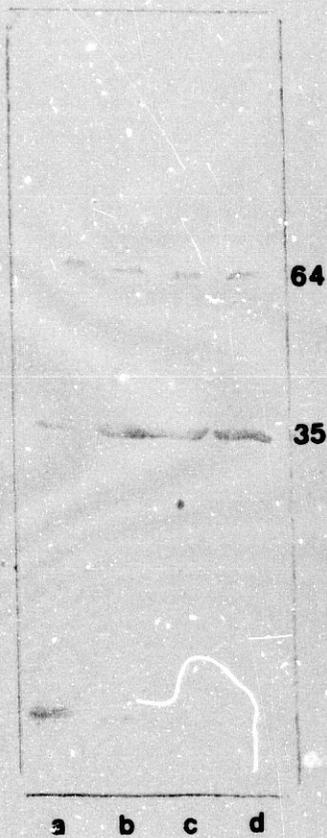


Fig. 24. Inmunoblot del suero VIII enfrentado a OMPs y revelado con anti IgG. Carril a: IP383 crecida a 37°C; carril b: IP383p- crecida a 37°; carril c: IP383 crecida a 25°C; carril d: IP383p- crecida a 25°C.

2.2.3.- EVOLUCION DE LA RESPUESTA DE IgA FRENTE A OMPs

No aparecieron niveles detectables de anticuerpos de clase IgA en sueros de animales infectados oralmente y obtenidos a los 2, 5 y 10 días de realizar la infección, frente a OMPs cromosómicas ni plasmídicas.

2.3.- REACCIONES CRUZADAS CON OMPs DE OTROS SEROGRUPOS

El hecho, repetidamente observado, de que los análisis por inmunoblotting presentan ocasionalmente limitaciones a la especificidad, y, por otra parte, las descripciones de reacciones cruzadas entre Yops dentro del género *Yersinia* (MAZZA et al., 1985; SKURNIK et al., 1984), plantearon la conveniencia de investigar estos aspectos en nuestro modelo experimental. Para ello, enfrentamos el suero I a OMPs de las cepas 025 y 025p- (del serogrupo O:3) e IP1476 (serogrupo O:4,33, ambiental). Los correspondientes inmunoblotting se muestran en la Fig. 25. En términos generales, no se observaron excesivas bandas de reacción cruzada, lo que corrobora la buena especificidad de la técnica seguida. Hubo una clara reacción con la Yop1 de la cepa 025 (carril d), aunque la banda de esta última se localizó a un peso molecular ligeramente superior al de la cepa IP383 (carril a). En cuanto a las OMPs cromosómicas, apareció una banda situada a 56 Kdal aproximadamente, en los 4 carriles, atribuible a una OMP que posee determinantes comunes en las 4 cepas. Asimismo, la región comprendida entre 37 y 35 Kdal presentó una configuración muy similar en las 4 cepas (especialmente en las pertenecientes a los serogrupos patógenos O:9 y O:3), si bien en nuestra experiencia esta

RESULTADOS

es la zona donde parecen registrarse mayores inespecificidades. Por último, el revelado de OMPs de la cepa IP1476 mostró sendas bandas localizadas por encima de 48 Kdal y aproximadamente a 45 Kdal (carril b). Estas bandas corresponden a OMPs que dan reacción cruzada con OMPs del serogrupo O:9, muy posiblemente con las más cercanas en peso molecular (48 y 45 Kdal, respectivamente). A destacar la presencia de bandas homólogas en los desarrollos de SDS-PAGE de las cepas O:3 (datos no mostrados), lo que significa que las proteínas en cuestión están presentes en estas cepas pero no poseen relaciones antigénicas con las del serogrupo O:9 ya que no reaccionan con los anticuerpos presentes en el suero I.

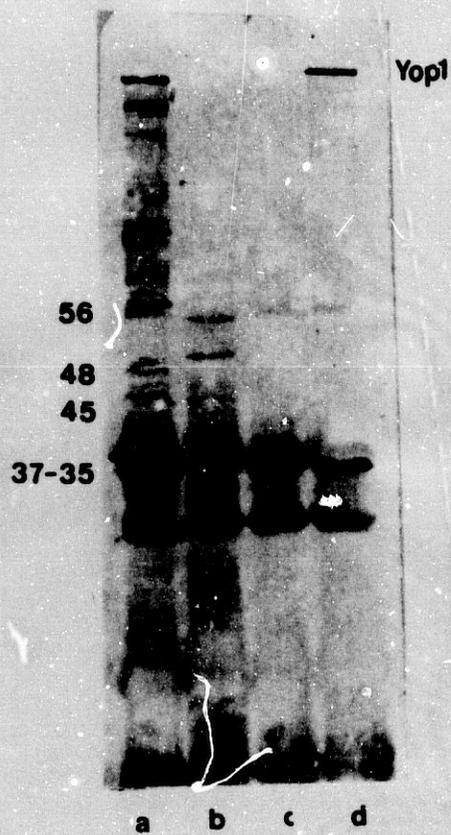


Fig. 25. Reacciones cruzadas entre OMPs de distintos serogrupos de *Y. enterocolitica*. OMPs obtenidas de bacterias crecidas a 37°C. Carril **a**: IP383; carril **b**: IP1476; carril **c**: O25p-; carril **d**: O25.

IV.3.- INMUNOCOMPLEJOS EN SUERO DE ANIMALES INFECTADOS ORALMENTE

La presencia de plásmido de virulencia confiere la capacidad para colonizar la mucosa ileal de forma persistente, aislandose bacterias viables durante varios días a partir de las placas de Peyer (JIMENEZ-VALERA et al., 1988). A diferencia de las cepas virulentas del serogrupo O:8, que rebasan el tejido linfoide local y regional y pasan a sangre, las del serogrupo O:9 carecen de esta capacidad, lo que ha sido comprobado experimentalmente por nosotros al practicar cultivos seriados de sangre y bazo de ratones infectados oralmente por IP383, sin encontrar en ningún caso aislamientos positivos (datos no incluidos en el presente trabajo). Sin embargo, la ausencia de bacterias viables en sangre no excluye la posible presencia de material antigénico, derivado de las bacterias que colonizan la mucosa ileal y las placas de Peyer. Al coincidir temporalmente con la respuesta de anticuerpos, estos antígenos podrían dar lugar a la formación de inmunocomplejos circulantes. La detección de inmunocomplejos en modelos experimentales de infección por *Y. enterocolitica* posee gran interés por cuanto puede representar una aproximación experimental al estudio de algunas complicaciones

inmunopatológicas de la yersiniosis (KEKOMÄKI et al., 1983). Por ello, aprovechamos la disponibilidad de sueros obtenidos 5 días después de infección oral para detectar, en primer lugar, la posible presencia de inmunocomplejos, y en su caso, la participación en ellos de OMPs de *Y. enterocolitica*.

La precipitación con PEG, según la técnica descrita para inmunocomplejos en Material Y Métodos, rindió sedimentos apreciables con todos los sueros ensayados, incluyendo los de animales sanos. Cuando los precipitados fueron redisueltos y analizados por inmunoblotting frente a un suero anti IP383 (el suero I), se reveló la presencia de dos bandas correspondientes a Yop1 (190 Kdal) y Yop5 (25 Kdal) en los inmunocomplejos procedentes de ratones infectados con IP383, mientras que el revelado del material procedente de animales infectados con IP383p- no mostró ninguna banda de carácter específico (Fig. 26, carriles a y b, respectivamente). El hecho de usar como fuente de anticuerpos anti-*Yersinia* un antisuero obtenido en ratón conllevó la necesidad de utilizar como conjugado anti-IgG de ratón, lo que explica la aparición de bandas correspondientes a las cadenas gamma presentes en los inmunocomplejos, y disociadas en monómeros (50 Kdal) o

RESULTADOS

dímeros (100 Kdal) por las condiciones reductoras del tampón de muestra para SDS-PAGE.

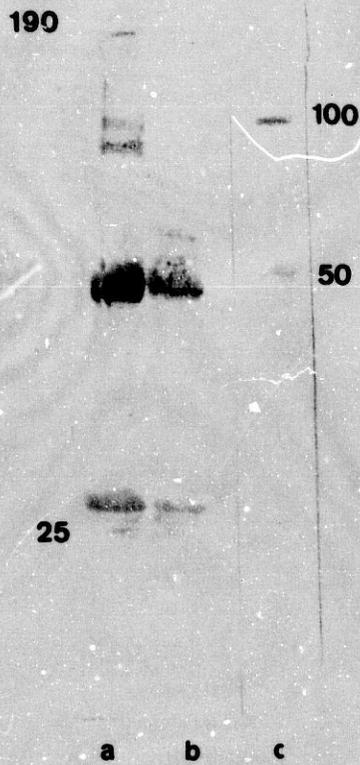


Fig. 26. Inmunocomplejos en sueros de ratón. Carril **a**: suero obtenido a los 5 días de la infección oral por IP383; carril **b**: suero obtenido a los 5 días de la infección oral por IP383p-; carril **c**: suero procedente de animales sanos.

IV.4.- ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE LA FORMACION DE COLONIAS POR CELULAS DE MEDULA OSEA EN EL SUERO DE ANIMALES INFECTADOS ORALMENTE

Los macrófagos que infiltran focos inflamatorios desarrollan una intensa e importante actividad secretora, produciendo, entre otros mediadores, las llamadas "proteínas tempranas de fase aguda" (SIPE y ROSENSTRICH, 1981). Estas son la interleukina 1, el factor necrosante de tumores y un factor estimulador de colonias de médula ósea (CSF) que promueve la proliferación y diferenciación de progenitores de macrófagos y neutrófilos (MELTZER y NACY, 1989). La colonización de la mucosa ileal por yersinias virulentas determina un proceso inflamatorio, habiéndose confirmado en modelos experimentales la infiltración del tejido por células inflamatorias (HANSKI et al., 1989). Cabe suponer, pues, que en el suero de los animales infectados oralmente por una cepa portadora del plásmido de virulencia, como IP383, aparecerá una actividad CSF detectable, que en cualquier caso debe ser más potente y persistente que la que pudiera aparecer en el suero de animales infectados con el derivado avirulento IP383p-. Para contrastar esta hipótesis, se hicieron determinaciones de actividad CSF en sueros obtenidos 5 días

después de la infección oral con las cepas, respectivamente. Como control positivo se incluyó suero de ratones previamente inyectados con LPS por vía intravenosa. Los resultados de estas experiencias (Tabla 4) revelaron una notable actividad CSF en los sueros de animales infectados con IP383, que supuso el 26.2% de la actividad mostrada por el suero control positivo. En contraposición, el suero de animales infectados con IP383p- reveló una actividad CSF de solo el 3.3% de la obtenida con el control positivo. Sin necesidad de recurrir a un análisis estadístico de los resultados, se puede afirmar que la actividad CSF inducida por la infección con la cepa virulenta fué significativamente superior (casi ocho veces mayor) que la inducida por el derivados isogénico avirulento.

Tabla 4. Actividad CSF en suero de ratones cinco días después de la infección oral por *Y. enterocolitica*

Agente inductor	Número de colonias por 10^5 células de médula ósea			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Media (DS) ^a
LPS ^b	137	149	164	150 (7.93)
IP383	38	34	46	39.7 (6.66)
IP383p-	3	5	7	5.0 (2.00)

^a Media aritmética de las tres experiencias (desviación estándar)

^b Control positivo

DISCUSSION

La técnica de Western Blot se ha utilizado para estudiar la evolución de la respuesta de anticuerpos frente a OMPs de *Y. enterocolitica* (serogrupo 0:9) en ratones infectados oralmente. Para ello, se han establecido previamente los perfiles en SDS-PAGE de las cepas usadas en el estudio, que constituyen un par isogénico con la única diferencia entre sí de la presencia o ausencia del plásmido de virulencia. Mediante el análisis por inmunoblotting se ha podido determinar la influencia de la expresión del plásmido de virulencia en la evolución de la respuesta. Para completar el panorama de la respuesta humoral inducida por la infección oral, se ha examinado la presencia de inmunocomplejos circulantes debidos a OMPs y, finalmente, la presencia en suero de factor estimulador de colonias (CSF) de progenitores de macrófagos y granulocitos. Se comentarán algunos aspectos de interés, referentes en primer lugar a las metodologías empleadas, y seguidamente a los resultados obtenidos con las distintas técnicas empleadas: SDS-PAGE, Western Blot para anticuerpos séricos, detección de inmunocomplejos y evaluación de CSF.

Aspectos metodológicos. La primera disyuntiva que se planteó al iniciarse el estudio de las OMPs de *Y. enterocolitica* por SDS-PAGE

fué la elección del método a seguir para la solubilización de la membrana citoplásmica presente en las envolturas celulares. Se probaron dos técnicas comunmente aceptadas, usando un detergente no iónico, el Tritón X-100, y uno aniónico, el Sarkosyl. Se pudo constatar que el tratamiento con Sarkosyl eliminó un mayor número de bandas, atribuibles a proteínas de membrana citoplásmica, lo que redundó en una mayor nitidez de los perfiles de OMPs, en comparación con los obtenidos tras solubilización con Tritón. En un estudio comparativo de diversos procedimientos para solubilizar proteínas de membrana citoplásmica de bacterias Gram negativas, FILIP et al. (1973) afirman que el Sarkosyl es capaz de solubilizar exclusivamente membrana citoplásmica en condiciones en las que otros detergentes (incluyendo el Tritón X-100) solubilizan también las proteínas presentes en membrana externa; sin embargo, en presencia de Mg^{2+} , la actividad solubilizadora del Tritón X-100 se restringe a la membrana citoplásmica. Si tomamos como cierto que el Sarkosyl respeta por completo la membrana externa, nuestros datos sugieren que el Mg^{2+} limita la solubilización por el Tritón X-100, no solo de las proteínas de membrana externa, sino también de algunas de membrana citoplásmica que aparecen contaminando los correspondientes perfiles de OMPs. La alternativa supone que el

tratamiento con Sarkosyl elimine determinadas OMPs, lo que está en contradicción con los resultados del mencionado trabajo de FILIP et al. (1973) y parece poco probable.

Otra alternativa metodológica que se exploró fué la delipidación por el método de Galanos. Este procedimiento, descrito inicialmente para la eliminación de LPS incompleto presente en cepas en fase rugosa, se reveló sin embargo eficaz en la delipidación parcial de las muestras analizadas por nosotros, provenientes de cepas lisas. La finalidad del tratamiento delipidizante, era la eliminación de posibles inespecificidades debidas a la contaminación de bandas de proteínas con restos de LPS, lo que ha sido señalado como una de las limitaciones más importantes a la eficacia de las técnicas de Western Blot (LEIVA, 1991). Se compararon las opciones de realizar la delipidación antes o después del tratamiento de las envueltas con Sarkosyl. Ambas cambiaron de forma significativa el perfil de OMPs, ya que en ambos casos se observó pérdida por solubilización de determinadas Yops y de OMPs cromosómicas; otras alteraciones del perfil electroforético (aparición de bandas) se pueden atribuir a la mayor o menor solubilización de proteínas, o a la alteración de las mismas por lo agresivo del tratamiento de

Galanos. Yop1 y Yop5 se vieron afectadas de forma opuesta según que la delipidación se realizara antes del tratamiento con Sarkosyl (pérdida parcial de Yop1, pero no de Yop5) o después del mismo (desaparición de Yop5 sin pérdidas importantes de Yop1). Estas diferencias de comportamiento pueden atribuirse a las distintas relaciones de ambas proteínas con los restantes componentes de la membrana externa, dado que Yop1 se sintetiza como una auténtica OMP mientras que las restantes Yops son proteínas destinadas a la secreción extracelular pero que son adsorbidas por la membrana externa (MICHIELS et al., 1990).

El rango de pesos moleculares de las Yops (según nuestros datos experimentales, desde 190 hasta 25 Kdal) hizo necesario el empleo de geles en gradiente desde 7.5 hasta 15% de poliacrilamida, para obtener adecuados geles electroforéticos. Los geles del 12.5% de poliacrilamida permitieron una buena caracterización de OMPs entre 100 y 14 Kdal, pero el recorrido de una proteína como Yop1 en estas condiciones era escaso y, sobre todo, los intentos de electrotransferencia a papel resultaron infructuosos para ella, incluso forzando las condiciones de electrotransferencia. En la Fig. 27 se presentan sendas tinciones de proteínas, practicadas después

de la electrotransferencia, (1) en el gel (se tiñen las proteínas no transferidas) y (2) en el papel (se tiñen las transferidas). Se observa una buena transferencia de las proteínas de peso molecular < 97 Kdal; de hecho, el estándar de mayor peso molecular se transfirió parcialmente, dando una banda muy apreciable en el papel. Sin embargo, la transferencia de Yop1 fué nula. El uso de un gel "blando" (7.5% de poliacrilamida) no se consideró adecuado por la falta de resolución por debajo de 45 Kdal. Por ello, las experiencias de inmunoblotting se realizaron partiendo de geles en gradiente. Pese a todo, el rendimiento de la electrotransferencia de Yop1 fué escaso incluso en estas condiciones, por lo que hubo de recurrirse a la adición de SDS al tampón de transferencia, como describen ERICKSON et al, (1982). El alto peso molecular, y posiblemente otras características de Yop1, dificultan pues su transferencia al papel, que solo es satisfactoria si se observan los requisitos técnicos señalados.

Respecto de la técnica de inmunoblotting, las mayores precauciones se dirigieron a evitar la aparición de reacciones inespecíficas que disminuyesen el valor de la técnica o complicasen la interpretación de los resultados. En nuestra experiencia, se

mostró decisiva la inclusión, en la solución diluyente del conjugado, de una cantidad suficiente (10%) de suero no inmune procedente de la misma especie animal en la que se obtuvo el conjugado (TOWBIN et al., 1979). La ausencia de inespecificidades nos permitió abordar el estudio de las reacciones cruzadas entre distintos serogrupos, con resultados esperables en cuanto a la relaciones antigénicas entre la Yopl de cepas 0:9 y 0:3. Otras relaciones antigénicas entre OMPs, o la ausencia de ellas, pueden tener valor en estudios sobre las relaciones filogenéticas entre los serogrupos patógenos y ambientales de *Y. enterocolitica*.

Finalmente, un último aspecto metodológico a comentar, referido a la técnica seguida para la precipitación de inmunocomplejos. Resultó sorprendente que el tratamiento con PEG produjera de forma persistente la aparición de precipitados en los sueros de animales sanos, si bien la precipitación de IgG agregada, que es una de las limitaciones de esta técnica (ABRASS, 1979), puede explicar este hecho.

Comentarios al análisis de proteínas codificadas por el plásmido de virulencia. La comparación entre las cepas IP383 e IP383p- permitió

poner de relieve un total de cuatro OMPs codificadas por el plásmido de virulencia. La caracterización de sus pesos moleculares definió tres de ellas como Yops descritas en la bibliografía (Yop1, Yop2 y Yop5). La cuarta es una proteína de 28 Kdal, no descrita con anterioridad.

Existen notables discrepancias en la bibliografía sobre los pesos moleculares atribuidos a Yop1, incluso dentro de un mismo serogrupo. En cepas del serogrupo 0:9, se han descrito pesos moleculares de Yop1 comprendidos en un rango desde 240 Kdal (SKURNIK et al., 1984) hasta 140 Kdal (CHALVIGNAG et al., 1988). Nuestros resultados apuntan a un peso molecular de Yop1 de 190 Kdal, el cual se encuentra muy próximo a 180 Kdal, peso éste asignado a Yop1 en el serogrupo 0:9 por KAPPERUD et al. (1985^b). La presencia de una OMP codificada por el plásmido a 37°C con un peso molecular ligeramente inferior a Yop1, detectada por nosotros en tinción de proteínas procedentes de bacterias crecidas en RPMI 1640, coincide con los resultados de KAPPERUD et al. (1985^b), quienes también la detectan a partir de bacterias cultivadas en medios celulares. En bacterias crecidas en BHI suplementado, esta OMP no

aparece en la tinción de proteínas, pero sí cuando el revelado se hace por inmunoblotting con suero de ratones inmunizados intraperitonealmente. Esto indica que su síntesis está muy disminuída pero no totalmente reprimida en este medio, al ser detectada por un método más sensible que la tinción de proteínas como es el uso de anticuerpos marcados. CHANG y DOYLE (1984) encuentran así mismo esta OMP en una cepa virulenta del serogrupo 0:8 crecida en medios bacteriológicos, cuando revelan las bandas por inmunoblotting, pero no por tinción de proteínas, asignándole un peso molecular de 140 Kdal. Una explicación alternativa a la aparición de este polipéptido podría ser el que se tratase de la propia Yop1 parcialmente degradada a formas de menor peso molecular, si bien se ha descrito que la adición de un inhibidor de proteasas durante el proceso no impide su aparición (CHANG y DOYLE, 1984). Realmente, en los perfiles obtenidos por nosotros a partir de bacterias virulentas crecidas en RPMI 1640 aparecen hasta cuatro bandas (pesos moleculares de 170, 118, 100 y 98), que también llegan a observarse en inmunoblotting cuando el medio de cultivo es BHI suplementado. Un patrón bastante similar, con al menos 4 bandas situadas entre Yop1 y 98 Kdal y con pesos moleculares muy próximos a los estimados por nosotros, ha sido descrito por HANSKI et al.

(1991) en el serogrupo 0:8 pero sólo cuando crece "in vivo", ya que en bacterias crecidas en BHI el inmunoblotting solo les permite observar una de estas bandas. Parece, pues, que las bacterias crecidas en RPMI 1640 tienen un comportamiento mas semejante a la situación "in vivo" que cuando crecen en un medio bacteriológico como es el BHI.

Otro punto a comentar está en relación a Yop2; este polipéptido se observó por tinción de proteínas desarrolladas en SDS-PAGE y obtenidas de bacterias crecidas a 37°C en RPMI 1640 pero no se detectó cuando las OMPs procedían de bacterias cultivadas en BHI suplementado. Sí aparece sin embargo en experiencias de inmunoblot, empleando OMPs procedentes de bacterias crecidas en BHI suplementado. El peso molecular estimado a partir de nuestros resultados fué de 49 Kdal, que se encuentra dentro del rango de pesos moleculares que para esta Yop han asignado distintos autores; según BOLIN et al. (1985) el peso de Yop2 puede estar comprendido entre 46 y 52 Kdal. CHALVIGNAG et al. (1988), estudiando las proteínas secretadas al medio por la misma cepa IP383 usada en el presente trabajo, asignan a la Yop2 un peso molecular de 47 Kdal, muy próximo al estimado por nosotros. Muy probablemente este polipéptido no sea

una Yop con entidad propia, sino que mas bien se trataría de formas monoméricas de Yop1; esta hipótesis podría explicar el hecho de que Yop2 aparezca en desarrollos de OMPs obtenidas de bacterias crecidas en RPMI 1640, donde se observa una superproducción de Yop1, con lo que las posibilidades de detectar formas monoméricas de la misma sería mucho mayor que si las bacterias proceden de BHI suplementado donde la producción de Yop1 es mucho menor. No obstante la mayor sensibilidad del inmunoblotting permite detectar pequeñas cantidades de estos monómeros, lo que explica su aparición al emplear esta técnica para OMPs procedentes de bacterias cultivadas en BHI suplementado. SKURNIK et al. (1984) y ZALESKA et al. (1985) han demostrado que Yop1 está constituido por monómeros, existiendo pequeñas diferencias en la asignación de sus correspondientes pesos moleculares: 52.5 Kdal según SKURNIK et al. (1984), o 47 Kdal según ZALESKA et al. (1985) y BOLIN et al. (1988). En nuestras experiencias de reducción de Yop1, la desaparición de la banda de 190 Kdal se acompañó de un notable incremento de la banda localizada a 49 Kdal; este valor es muy próximo a los asignados a los monómeros de Yop1. Sin embargo, las evidencias obtenidas no nos permiten concluir si la posición de 49 Kdal corresponde exclusivamente a monómeros de Yop1 o si estos se

superponen a una auténtica Yop2. Si aceptamos como válida la extrapolación de datos obtenidos con otros serogrupos, ganaría peso la hipótesis de que se trata de dos proteínas distintas (Yop2 y monómero de Yop1), ya que según SKURNIK (1985), en el serogrupo 0:3, donde Yop1 es de mayor tamaño, su monómero se localiza en 52.5 Kdal, mientras que en 49 Kdal aparece una proteína mediada por el plásmido, que pudiera ser Yop2, si bien esto no se puede asegurar de forma definitiva ya que en ese trabajo se parte de proteínas totales de envoltura y no de OMPs.

El peso molecular establecido para Yop5 a partir de nuestros resultados fué de 25 Kdal, lo que coincide con el determinado por CHALVIGNAG et al. (1988) y por CORNELIS et al. (1987^a). Sin embargo en el desarrollo electroforético de OMPs obtenidas por tratamiento con Tritón X-100, Yop5 apareció con un peso molecular de 23 Kdal; esta discrepancia puede justificarse por el distinto tratamiento al que se sometieron las proteínas, lo cual es un factor junto con el medio de cultivo y proceso de análisis que influye decisivamente en el peso molecular de las OMPs (CORNELIS et al., 1987^a).

Aunque la atención de los investigadores se ha centrado en el

estudio de aquellas proteínas codificadas por el plásmido que se localizan en la membrana externa, dado que por su carácter de componentes superficiales deben tener sin duda mayor relevancia como determinantes de virulencia, nosotros hemos creído de interés completar el conocimiento sobre el papel de' plásmido en la codificación de proteínas de pared analizando proteínas totales de envuelta en lugar de OMPs. Un resumen de la información sobre proteínas codificadas por el plásmido que se obtiene de nuestros datos experimentales se presenta en la Tabla 5. La simple comparación de los perfiles de proteínas totales de envueltas entre IP383 e IP383p- crecidas a 37°C reveló la presencia de cinco proteínas mediadas por el plásmido de virulencia, dos de las cuales no aparecieron en los perfiles de OMPs, por lo que no corresponden a Yops. Se trata de proteínas de 41 Kdal y 37 Kdal. Sin embargo, la profusión de bandas en los perfiles de proteínas totales de envuelta dificulta este tipo de análisis, por lo que la enumeración anterior no puede considerarse exhaustiva. En un intento por mejorar la resolución, aumentando asimismo la sensibilidad, recurrimos a la técnica de inmunoblotting usando suero de animales inmunizados intraperitonealmente, adsorbido con la cepa IP383p- para retirar los anticuerpos dirigidos contra proteínas de codificación cromosómica.

Este suero es pues un reactivo selectivo para detectar proteínas codificadas por el plásmido, lo que se corroboró por la ausencia de bandas al revelar con él desarrollos de proteínas totales de envuelta de la propia IP383p-. En estas condiciones, el inmunoblotting reveló al menos ocho bandas correspondientes a proteínas mediadas por el plásmido, de las cuales cuatro no aparecieron en los perfiles de OMPs revelados asimismo por inmunoblotting (lo que excluye que su ausencia de estos perfiles se debiese a falta de sensibilidad en los revelados). Una de estas cuatro proteínas coincide en su posición con la de 37 Kdal revelada por tinción de proteínas, a la que hemos hecho mención anteriormente; no obstante, su acompañante de 41 Kdal en el revelado por dicha tinción no aparece en el inmunoblotting. Dado que este procedimiento es mucho más sensible, la única explicación plausible es que la proteína de 41 Kdal no resulte inmunogénica en los animales infectados intraperitonealmente. De similar manera, la Yop5 aparece en los perfiles que se revelan por tinción de proteínas pero no en los que se revelan por inmunoblotting con suero de animales infectados intraperitonealmente. La repetición de esta ausencia de banda en inmunoblotting, usando sueros adsorbidos o no, y partiendo de proteínas totales de envoltura o de OMPs,

confirma la consistencia de esta observación. Como se verá más adelante, los sueros de animales infectados oralmente sí contienen anticuerpos anti-Yop5, lo que indica que esta proteína plantea un interesante problema de inmunogenicidad que depende de la vía de infección. Si reunimos la información aportada por ambos métodos, se identifican hasta diez proteínas de envolturas completas, codificadas por el plásmido de virulencia. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por SKURNIK (1985) en un estudio similar sobre el serogrupo 0:3, encontramos que cinco de estas diez proteínas coinciden o se aproximan mucho en sus pesos moleculares: dos de ellas son OMPs (Yop2 y la OMP de 28 Kdal), y las otras tres son proteínas de 46, 41 y 37 Kdal que no nos aparecen entre las OMPs. Las discrepancias deben atribuirse principalmente a la diferencia de serogrupo; así por ejemplo, en el trabajo citado Yop1 aparece con un peso molecular de 240 Kdal. Puede plantearse aquí la duda de que algunas de las proteínas codificadas por el plásmido que nosotros detectamos en envolturas pero no en OMPs fueran realmente Yops que se pierden durante el proceso de purificación de OMPs, aunque este riesgo solo debiera afectar a proteínas con carácter hidrosoluble (MICHIELS et al., 1990). Si comparamos nuestros datos con los de otros autores que trabajan con el serogrupo 0:9 (datos recopilados

por CORNELIS et al., 1987^a), observamos que las proteínas de 41 Kdal (no inmunógena en nuestro modelo de infección intraperitoneal) y de 37 Kdal coinciden en sus pesos moleculares con Yop3 y Yop4, respectivamente. Ambas proteínas no figuran entre las que por su hidrosolubilidad pueden perderse en los lavados (MICHIELS et al., 1990). En nuestros revelados de OMPs por inmunoblotting no hemos conseguido detectar estas dos Yops, ni con sueros de animales infectados intraperitonealmente ni con los de animales infectados por vía oral.

Comentarios al análisis de la respuesta de anticuerpos en animales infectados oralmente. En primer lugar, se debe mencionar la ausencia de bandas en todos los revelados hechos con suero de animales no infectados (controles negativos), lo que confirma la validez de la técnica en cuanto a la ausencia de inespecificidades de cualquier origen.

El análisis de los sueros recogidos tempranamente tras la infección, a un tiempo (2 días) insuficiente para detectar el inicio de la respuesta primaria de anticuerpos, permite sin embargo explorar otros factores, como pudiera ser la presencia de reacciones cruzadas

que al estimular la memoria inmunológica pre-existente determinase respuestas secundarias precoces; aunque los ratones usados respondían a la especificación de libres de gérmenes, ello no excluye la existencia de una microbiota comensalista, algunos de cuyos componentes podrían presentar comunidades antigénicas con las yersinias. La ausencia de bandas en los desarrollos de OMPs revelados con estos sueros demostró la inexistencia de reacciones de este tipo que pudieran interferir en nuestro estudio. Esta situación quedó confirmada al estudiar la evolución comparativa de las respuestas de IgM e IgG, que en todas las bandas se sucedieron de acuerdo al concepto de cambio de clase de inmunoglobulina en el curso de la respuesta primaria (en el caso de intervenir la memoria inmunológica, el componente de IgM hubiera sido mínimo y la respuesta sería desde el primer momento, mayoritariamente de IgG).

En los sueros de 5 días post-infección se advierte ya la presencia de IgM específica para Yops y para proteínas mediadas por el cromosoma. Frente a algunas de estas últimas se detecta ya a este tiempo el inicio de la respuesta de IgG. Transcurridos 10 días desde la infección, la respuesta de IgG es dominante, aunque en algunos casos concretos persiste la IgM. En conjunto, pues, la

respuesta observada tiene la típica evolución de una respuesta timodependiente, pero un análisis pormenorizado descubre ciertos aspectos de interés.

En lo que se refiere a la respuesta a las Yops (resumida en la Tabla 6), cabe destacar en primer lugar la mayor inmunogenicidad de Yop1 y Yop5, que son las únicas frente a las que se detecta respuesta de IgM a los 5 días de la infección. La evolución de la respuesta a Yop1 es típicamente timodependiente, ya que a los 10 días del inicio de la infección, la IgM ha sido sustituida por IgG. En cambio, la respuesta a Yop5 es atípica; en los animales infectados por vía oral se comporta como un antígeno timoindependiente, ya que la respuesta es de IgM sin que se detecte el cambio a producción de IgG. Además, cuando la infección se hace por vía intraperitoneal, no se detecta respuesta de IgG a esta proteína. Claramente, Yop5 es inmunógena de por sí; por otra parte, no hay ninguna razón para pensar que las bacterias no expresen Yop5 en la cavidad peritoneal y sí en la mucosa ileal, ya que en los sueros de inmunización intraperitoneal hay respuesta frente a cuatro Yops y otras cuatro proteínas de envuelta mediadas por el plásmido. Cabe pensar que en el suero de animales infectados intraperitonealmente, persista la

respuesta de IgM a Yop5. Debe tenerse en cuenta que los animales sometidos a infección intraperitoneal recibieron varias inoculaciones por esta vía, siguiendo una pauta de hiperinmunización. Es conocido que al menos algunos antígenos timoindendientes no inducen respuesta de IgG ni memoria inmunológica porque estimulan células T supresoras preferentemente a células T memoria. En tal caso, la reiteración de estímulos no llevaría nunca a inducir respuesta de IgG, que fué la única clase de inmunoglobulina buscada en los sueros de infección intraperitoneal. El comportamiento de Yop5 es pues explicable admitiendo que se trate de un antígeno timoindendiente.

La respuesta a Yop2 se detecta en el suero de animales infectados intraperitonealmente (IgG) pero no en el de los infectados por vía oral, donde no aparecen bandas de IgM ni de IgG ni a los 5 ni a los 10 días de la infección. La o las proteínas presentes en esta banda deben ser escasamente inmunógenas, puesto que parecen requerir reitaradas inmunizaciones para inducir una respuesta apreciable. Dado que hemos confirmado la ubicación de monómeros de Yop1 en este peso molecular, hay que admitir que los epítomos presentes en Yop1 no se encuentran en estos monómeros, dado que

los sueros de infección oral reaccionan con Yopl pero no con el monómero de 49 Kdal.

Frente a la Yop localizada a 28 Kdal solo hemos podido detectar respuesta de IgG. Es muy posible que una débil respuesta de IgM nos haya pasado desapercibida. No parece muy probable que exista memoria inmunológica previa frente a esta proteína, por reacción cruzada antígenos de distinto origen, ya que la respuesta de IgG en sueros de infección oral aparece tardíamente (entre los 5 y 10 días después de la infección).

Dado que las cepas IP383 e IP383p- comparten idéntico background cromosómico (corroborado por el idéntico patrón de respuesta de los sueros de animales infectados con IP383p- frente a OMPs de IP383 y OMPs de IP383p-), las diferencias de respuesta frente a OMPs cromosómicas son atribuibles a diferencias de comportamiento entre ambas cepas en el curso de la infección "in vivo". Estas diferencias de comportamiento, a su vez, resultan del papel de los factores de virulencia codificados por el plásmido, que determinan una mayor extensión y persistencia de la colonización de la mucosa y placas de Peyer por IP383, y por consiguiente, que las

mismas proteínas causen estímulos antigénicos más potentes cuando son portadas por IP383 que cuando lo son por IP383p-. Esto es, en efecto, lo que se observa cuando se comparan las respuestas a OMPs cromosómicas de animales infectados con IP383 (resumidas en la Tabla 7) y de animales infectados con IP383p- (Tabla 8). Los animales infectados con IP383 responden frente a seis de las ocho OMPs cromosómicas previamente caracterizadas por inmunoblotting con suero de infección intraperitoneal; a los 5 días, hay respuesta de IgM frente a cinco de ellas, en dos de las cuales también aparece respuesta de IgG; a los 10 días, se mantiene la respuesta de IgM, pero desaparece la IgG frente a la OMP de 84 Kdal y, de forma llamativa, aparece una fuerte banda de IgG frente a la OMP de 35 Kdal, que no había dado reacción con IgM ni con IgG a los 5 días. Los animales infectados con IP383p- responden solo frente a cinco de las ocho OMPs; la respuesta de IgM a los 5 días es más débil que la de los animales infectados con IP383, y a los 10 días solo se mantiene frente a la OMP de 64 Kdal, no siendo sustituida por respuesta de IgG excepto en la mencionada OMP de 64 Kdal, donde ambas clases coexisten a los 5 y 10 días; a los 10 días de la infección con IP383p- aparece una fuerte banda de 35 Kdal con IgG, de forma similar a lo observado en los sueros de animales infectados con la cepa

virulenta. Este comportamiento de la OMP de 35 Kdal es notable, ya que la respuesta de IgG es tardía pero intensa, y no va precedida de IgM detectable.

Presencia de inmunocomplejos. La formación de inmunocomplejos por Yop1 y Yop5 revela que en el curso de la infección con IP383 hay fracciones bacterianas que pasan a sangre, aunque aparentemente no lo hagan las bacterias viables. Estos resultados pueden tener especial interés como base experimental para explicar el hallazgo de inmunocomplejos en sueros de enfermos humanos con yersiniosis reciente, especialmente en aquellos que han padecido gastroenteritis prolongada (KEKOMÄKI et al., 1983). La naturaleza del antígeno presente en los inmunocomplejos de enfermos humanos no ha sido esclarecida, aunque hay alguna evidencia experimental sugiriendo la participación de antígenos bacterianos distintos del LPS (KEKOMÄKI et al., 1983). Nuestros resultados indican que las mencionadas Yops son candidatos a componentes de inmunocomplejos que podrían desempeñar un papel en las complicaciones inmunopatológicas de la yersiniosis (AHVONEN et al., 1969; WINBLAD, 1975).

Presencia de CSF. La existencia de CSF en el suero de los animales infectados por vía oral constituye un indicador de la infiltración por macrófagos inflamatorios en los tejidos infectados. Las notables diferencias cuantitativas en la actividad CSF entre sueros de animales infectados con IP383 e IP383p- son una prueba más de la mayor intensidad y persistencia de la infección con la cepa virulenta.

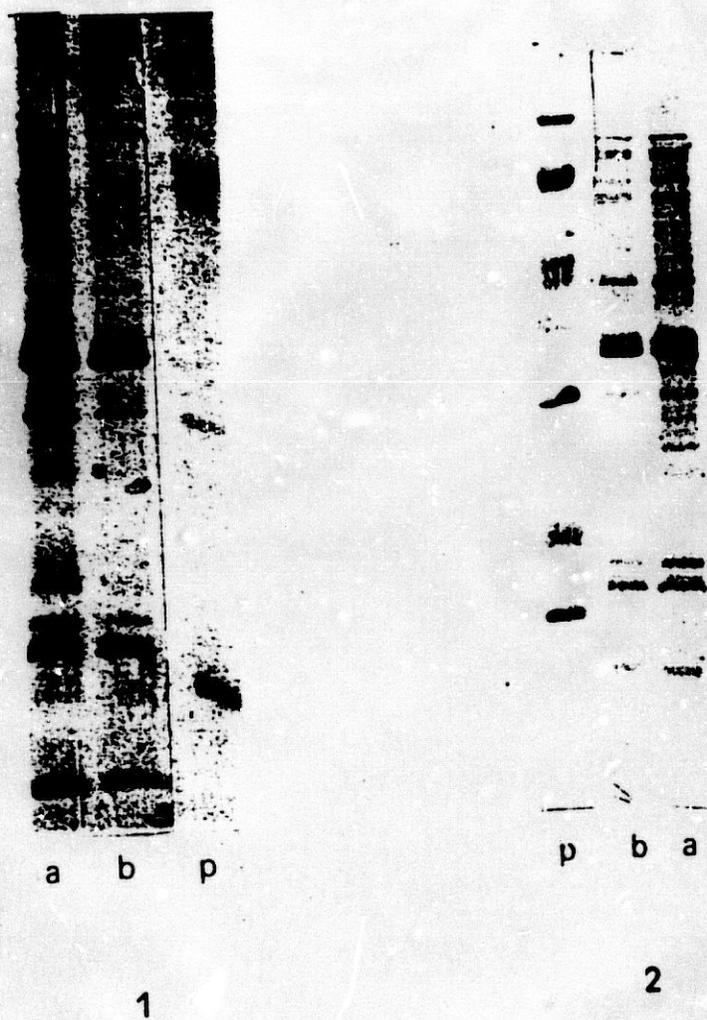


Fig. 27. Tinción de OMPs de *Y. enterocolitica* crecida a 37°C. (1) proteínas remanentes en el gel después de realizar la electrotransferencia; (2) proteínas transferidas al papel de nitrocelulosa. Carril a: IP383; carril b: IP383p; p: patrón de pesos moleculares.

Tabla 5. Proteínas de envuelta (identificadas por peso molecular en Kdal) mediadas por el plásmido

Técnica por la que se detectan	
SDS-PAGE	Inmunoblotting
190 ^a	190 ^a 170 ^a 62. 49 ^a 46
49 ^a	
41	37-35
37	32 28 ^a
25 ^a	

^a Proteínas presentes en la membrana externa

Tabla 6. Respuesta a OMPs plasmídicas en infección por IP383

Pm (Kdal)	inmunización i.p.	infección oral								
		2 días			5 días			10 días		
	IgG	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
190	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
170	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
49	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
25	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Tabla 7. Respuesta a OMPs cromosómicas en infección por IP383

Pm (Kdal)	inmunización i.p.	infección oral								
		2 días			5 días			10 días		
	IgG	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
84	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
64	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
58	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
56	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 8. Respuesta a OMPs cromosómicas en infección por IP383p-

Pm (Kdal)	inmunización i.p.			infección oral						
	IgG	2 días			5 días			10 días		
		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
84	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
64	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
58	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Entre las proteínas codificadas por el plásmido de virulencia de la cepa IP383 del serogrupo 0:9 de *Yersinia enterocolitica*, se identifican las siguientes Yops: Yop1 (190 Kdal), Yop2 (49 Kdal) y Yop5 (25 Kdal).
2. Se identifica una nueva proteína de membrana externa, codificada por el plásmido de virulencia, con un peso molecular de 28 Kdal.
3. El monómero obtenido por reducción de la Yop1 de la cepa IP383 de *Yersinia enterocolitica* presenta un peso molecular estimado en 49 Kdal.
4. El crecimiento de *Yersinia enterocolitica* a 37°C en el medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 determina una producción de Yop1 notablemente mayor que en medios de cultivo bacteriológicos como el BHI.
5. El comportamiento de *Yersinia enterocolitica* en el medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 a 37°C imita a su comportamiento "in vivo" en lo que se refiere a la producción de al menos cuatro proteínas de membrana externa, de pesos moleculares comprendidos

entre 170 y 98 Kdal (ambos inclusive), codificadas por el plásmido de virulencia.

6. Las reacciones cruzadas discernibles por inmunoblotting entre OMPs del serogrupo 0:9 y OMPs de los serogrupo 0:3 (patógeno) y 0:4,33 (ambiental) fueron escasas, destacando la observada entre Yop1 de 0:9 y de 0:3.

7. La presencia del plásmido de virulencia potencia la respuesta de anticuerpos frente a proteínas de membrana externa codificadas por el cromosoma, en el curso de la infección oral por *Yersinia enterocolitica*.

8. Una proteína de membrana externa de 35 Kdal, codificada por el cromosoma de *Yersinia enterocolitica*, induce en los ratones infectados oralmente una tardía pero intensa respuesta de IgG, que no se ve influenciada por el plásmido de virulencia.

9. Las características de la respuesta de anticuerpos inducida por Yop5 la definen como un antígeno timoindependiente.

10. En el curso de la infección oral del ratón con *Yersinia enterocolitica* portadora del plásmido de virulencia, aparecen inmunocomplejos circulantes en los que participan Yop1 y Yop5.

11. La presencia del plásmido de virulencia se asocia a la inducción de una potente actividad estimuladora de la formación de colonias de progenitores de granulocitos y macrófagos (CSF), en el suero de ratones infectados oralmente con *Yersinia enterocolitica*.

- ABRAAS, C.K. 1979. Circulating immune complexes: their immunochemistry, detection and importance. *Ann. Inter. Med.* 91: 430-440.
- AHO, K., P. AHVONEN, A. LASSUS, K. SIEVERS y A. TIILIKAINEN. 1974. HLA 27 in reactive arthritis: a study of yersinia arthritis and Reiter's disease. *Arthr. Rheum.* 17:521-526.
- AHVONEN, P., K. SIEVERS y K. AHO. 1969. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatologica Scandinavica* 15:232-253.
- AHVONEN, P., E. THAL y H. VASENIUS. 1973. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in animals in Finland and Sweden. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 2:135-136.
- ALEKSIC, S., A.G. STEIGERWALT, J. GOCKEMÜHI, G.P. HUNTLEY-CARTER y D.J. BRENNER. 1987. *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:327-332.
- AULISIO, C.G., W.E. HILL, J.T. STANFIELD y R.L. SELLERS. 1983. Evaluation of virulence factor testing and characteristics of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 40:330-335.
- BALLIGAN, G., Y. LAROCHE y G. CORNELIS. 1985. Genetic analysis of virulence plasmid from a sergroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect. Immun.* 48:782-786.
- BECH, K., J. NERUP y J.H. LARSON. 1977. *Yersinia enterocolitica* infection and thyroid diseases. *Act. Endocrinol. Scand.* 84:87-91.
- BERCOVIER, H., A.G. STEIGERWALT, A. GUIYOULE, G. HUNTLEY-CARTER y D.N. BRENNER. 1984. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:166-172.
- BERCOVIER, H., J. URSING, D.J. BRENNER, A.G. STEIGERWALT, G.R. FAUNING, J.M. ALONSO y H.H. MOLLARET. 1980. *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Current Microbiol.* 4:219-224.
- BHADURI, S., L.K. CONWAY y R.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.

- BISSETT, J.L., C. POWERS, S.L. ABBOTT y M. JANDA. 1990. Epidemiologic investigation of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. *J. Clin. Microbiol.* 28:910-912.
- BOLIN, I. y H. WOLF-WATZ. 1988. The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol. Microbiol.* 2:237-245.
- BOLIN, I., A. FORSBERG, L. NORLANDER, M. SKURNIK y H. WOLF-WATZ. 1988. Identification and mapping of the temperature-inducible, plasmid-encoded proteins of *Yersinia* spp. *Infect. Immun.* 56:343-348.
- BOLIN, I., L. NORLANDER y H. WOLF-WATZ. 1982. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect. Immun.* 37:506-512.
- BOLIN, I., D.A. PORTNOY y G. WOLF-WATZ. 1985. Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of yersiniae. *Infect. Immun.* 48:234-240.
- BOLIN, I., L. NORLANDER y H. WOLF-WATZ. 1982. Temperature inducible-outer membrane proteins of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect. Immun.* 37: 506-512.
- BOTTONE, E.J. 1983. Current trends of *Yersinia enterocolitica* isolates in the New York City area. *J. Clin. Microbiol.* 17:63-67.
- BOTTONE, E.J. 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* 5: 211-241.
- BOUZA, A., A. DOMINGUEZ, M. MESEGUER, L. BUZON, D. BIOXEDA, M.J. REVILLO, L. DE RAFAEL y J. MARTINEZ BELTRAN. 1980. *Yersinia enterocolitica* septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:404-409.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- BRAUNSTEIN, H., E.B. TUCKER y B.C. GIBSON. 1971. Mesenteric lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica*. Report of a case. *Am. J. Clin. Pathol.* 55:506-510.
- BRENNER, D.J., H. BERCOVIER, J. URSING, J.M. ALONSO, A.G. STEIGERWALT, G.R. FAUNING, G.P. CARTER y H.H. MOLLARET. 1980. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formely called

- atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica* like). *Current Microbiol.* 4:207-212.
- BRUBAKER, R.R. 1991. Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersiniae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:309-324.
- BRUBAKER, R.R. 1967. Growth of *Pasteurella pseudotuberculosis* in simulated intracellular and extracellular environments. *J. Infect. Dis.* 117:403-417.
- BRUNING, M. 1975. A case of contamination of donor by *Yersinia enterocolitica* type 9. *Medikson* 4:30.
- BRZOSTEK, K. y W.W. NICHOLS. 1990. Outer membrane permeability and porin proteins of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol. Letters* 70:275-278.
- BUKHOLM, G., G. KAPPERUD y M. SKURNIK. 1990. Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect. Immun.* 58:2245-2251.
- BUNDLE, D.R., M.A.J. GIDNEY, M.B. PERRY, J.R. DUNCAN y J.W. CHERWONOGRODZKY. 1984. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 0-antigens by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 46:389-393.
- BUROWS, T.W. y G.A. BACON. 1960. W and W antigens in strains of *Pasteurella pseudotuberculosis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 41:38-44.
- BURROWS, T.W. y G.A. BACON. 1956. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. *Br. J. Exp. Pathol.* 37:481-493.
- BUTZLER, J.P., M. ALEXANDER, A. SEGERS, N. CREMER y D. BLUM. 1978. Enteritis, abscess and septicemia due to *Yersinia enterocolitica* in a child with thalassemia. *J. Pediatr.* 93:619-621.
- CARNIEL, E., J.C. ANTOINE, A. GUIYOULE, M. GUISO y H.H. MOLLARET. 1989. Purification, location, and immunological characterization of the iron-regulated high-molecular-weight proteins of the highly pathogenic *Yersiniae*. *Infect. Immun.* 57:540-545.
- CARNIEL, E., D. MAZIGH y H.H. MOLLARET. 1987. Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence. *Infect. Immun.* 55:277-280.
- CARTER, P.B., R.J. ZAHORCHAK y R.R. BRUBAKER. 1980. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28:638-640.
- CORNELIS, G., Y. LAROCHE, G. BALLIGAN. 1987^a. *Yersinia*

- enterocolitica* a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. 9:64-86.
- CORNELIS, G., C. SLUITERS, C. LAMBERT DE ROUVROIT y T. MICHIELS. 1989. Homology between vir F, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and ara C, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. J. Bacteriol. 171:252-262.
- CORNELIS, G., M-P. SORY, Y. LAROCHE e I. DERCLYE. 1986. Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence in *Yersinia enterocolitica* 0:9 by mini-mu insertion and lac gene fusions. Microbial. Pathogenesis 1:349-359.
- CORNELIS, G., J.C. VANOOTEDEM y C. SLUITERS. 1987^b. Transcription of the yop regulon from *Yersinia enterocolitica* requires trans acting PYV and chromosomal genes. Microb. Pathog. 2:367-379.
- CROSA, J.H. 1984. The relationship of plasmid mediated iron transport and bacterial virulence. Annu. Rev. Microbiol. 38:69-89.
- CHALVIGNAG, H.A., E. CARNIEL, C. TRAM, A. JOSEPH-FRANCOIS y H.H. MOLLARET. 1988. En vitro expression of a 22-kilodalton *Yersinia pestis* polypeptide immunologically related to the 25-kilodalton plasmid-encoded protein of the three pathogenic *Yersinia* species. Infect. Immun. 56:2576-2580.
- CHANG, M.T., M.P. DOYLE. 1984. Identification of specific outer membrane polypeptides associated with virulent *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 43:472-476.
- DANIELS, J.J. y C. GOODZWAARD. 1963. Enkle stammen van een op *Pasteurella pseudotuberculosis* gelijkend niet geïdentificeerd species, geïsoleerd bij knaagdieren. Diergeneesk 88:96-102. Referido por: Brenner, D.J., J. Ursing, H. Bercovier, A.G. Steigerwalt, G.R. Fauning, J.M. Alonso y H.H. Mollaret. 1980. Deoxyribonucleic acid relatedness in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica* like organisms. Current Microbiol. 4:195-200.
- DAUSSET, J. 1981. HLA et maladies, p. 381-403. En J. Dausset (ed.), HLA 1982. Flammarion, Paris.
- DIAZ, R., M. IRIARTE, M.C. DEL OLMO y M.C. FRADES. 1991. Aislamiento de *Yersinia enterocolitica* 0:8 en España. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Salamanca 1991.
- DICKINSON, A. y MOCQUOT, G. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. I *Enterobacteriaceae* and other gram-negative bacteria. J. Appl. Bact. 24:252-284.

- DIGEON, M., M. LAVER, J. RIZA y J.F. BACH. 1977. Detection of circulating immune complexes in human sera by assays with polyethylene glycol. *J. Immunol. Methods* 16:165-183.
- ERICKSON, P.F., L. N. MINIER y S. LASHER. 1982. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunautoradiographic detection of antigens. *J. Immunol. Methods* 51:241-249.
- FARMER III J.J. y M.T. KELLY. 1991. *Enterobacteriaceae*. p. 360-383. En: A. BALOWS, W.J. HAUSLER, K.L. HERRMANN, H.D. ISENBERG y H.J. SHADOMIS (Eds.). "MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY" fifth edition. 1991. ASM Washington D.C.
- FERBER, D.M. y R.R. BRUBAKER. 1981. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 31:839-841.
- FILIP, C., G. FLETCHER, J.L. WULFF y C.F. EARHART. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* 115:717-722.
- FORSBER, A. y H. WOLF-WATZ. 1990. Genetic analysis of the *YopE* region of *Yersinia* spp.: Identification of a novel conserved locus, *yerA*, regulating *yopE* expression. *J. Bacteriol.* 172:1547-1555.
- FORSBERG, A. y H. WOLF-WATZ. 1988. The virulence protein Yop5 of *Yersinia pseudotuberculosis* is regulated at transcriptional level by plasmid-PIBI-encoded trans-acting elements controlled by temperature and calcium. *Mol. Microbiol.* 2:121-133.
- FORSBERG, A., I. BOLIN, L. NORLANDER y H. WOLF-WATZ. 1987. Molecular cloning and expression of calcium-regulated, plasmid-coded proteins of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathogen.* 2:123-137.
- FORSBERG, A., I. BOLIN, L. NORLANDER y H. WOLF-WATZ. 1987. Molecular cloning and expression of calcium-regulated, plasmid-coded proteins of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathog.* 2:123-137.
- FOWLER, J.M. y R.R. BRUBAKER. 1986. Immunology of yersiniae, p. 371-374. En: N.R. ROSE, H. FRIEDMAN y J.L. FAHEY (Eds.). "MANUAL OF CLINICAL LABORATORY IMMUNOLOGY". A.S.M. Washintong, D.C.
- FREDERIKSEN, W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). Scandinavian Congress of Pathology and Microbiology 14:103-104.
- GALANOS C., LÜDERITZ O., WESTPHAL O. 1969. A new method for

- extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 31: 245-249.
- GEMSKI, P., J.R. LAZERE y T. CASEY. 1980^a. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolica*. Infect. Immun. 27:682-685.
- GEMSKI, P., J.C. FEELEY, T. CASEY y J.A. WOHLHIETER. 1980^b. Presence of a virulence associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 28:1044-1047.
- GOGUEN, J.D., J. YOTHER y S.C. STRALEY. 1984. Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* Mu d1 (Ap lac) insertion mutant. J. Bacteriol. 160:842-848.
- GOGUEN, J.D., W.S. WALKER, T.P. HATCH y J. YOTHER. 1986. Plasmid-determined cytotoxicity in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 51:788-794.
- GRANFORS, K., M. VILJANEN, A. TIILIKAINEN y A. TOIVANEN. 1980. Persistence of IgM, IgG and Ig A antibodies to *Yersinia* in yersinia arthritis. J. Infect. Dis. 141:424-429.
- GRANFORS, K. 1979. Measurement of immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: persistence of serum antibodies during disease. J. Clin. Microbiol. 9:336-341.
- GRÖNBERG, A. y E. KIHLSSTRÖM. 1989. Structural variations and growth potential of *Yersinia enterocolitica* under different culture conditions. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 97:227-235.
- HANSKI, C., U. KUTSCHKA, J.P. SCHMORANZER, M. NAUMANN, A. STALLMACH, H. HAHN, H. MENGE y E.O. RIECKEN. 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. Infect. Immun. 57:673-678.
- HANSKI, C., M. NAUMANN, A. GRÜTZKAU, G. PLUSCHKE, B. FRIEDRICH, H. HAHN y E.O. RIECKEN. 1991. Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 59:1106-1111.
- HASSIG, A., J. KARER y F. PUSTERLA. 1949. Über pseudotuberculose beim Menschen. Schweizerische Medizinische Wochenschrift 79:971-973. Referido por: Swaminathan, B., M.C. Harmon y J.J. Mehlman. 1982. A review *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol. 52:151-183.
- HAWKES, R., E. NIDAY y J. GORDON. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal Biochem. 119: 142-147.

- HEESEMANN, J., C. KELLER, R. MORAWA, N. SCHMIDT, H.J. SIEMENS y R. LAUFS. 1983. Plasmid of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147:107-115.
- HEESEMANN, J. y R. LAUFS. 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155:761-767.
- HEESEMAN, J., B. ALGERMISSEN y R. LAUFS. 1984. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 46:105-110.
- HIGUCHI, K. y J.L. SMITH. 1961. Studies on the nutrition and physiology of the *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. *J. Bacteriol.* 81:605-608.
- HORSTEIN, M.J., A.M. JUPEAU, M.R. SCAVIZZI, A.M. PHILIPPON y P.A.D. GRIMONT. 1985. *In vitro* susceptibilities of 126 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* to 21 β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:806-811.
- HUBBERT, W.T. 1972. Yersiniosis in mammals and birds in the United States. Case reports and review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:458-463.
- JIMENEZ-VALERA, M., A. RUIZ-BRAVO, M.C. GOMEZ y A. RAMOS-CORMENZANA. 1988. Effect of the combination of clavulanic acid and cephalotin on an experimental infection with *Yersinia enterocolitica* in iron-overloaded mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:707-713.
- KANDOLO, K. y G. WAUTERS. 1985. Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* 21:980-982.
- KAPPEDRUD, G. 1981. Survey on the reservoirs of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in Scandinavia. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 89:29-35.
- KAPPERUD, G., E. NAMORK, M. SKURNIK y T. NESBAKKEN. 1987. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein Yop1 and possible importance for pathogenesis. *Infect. Immun.* 55:2247-2254.
- KAPPERUD, G. 1980. Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. 1. Enterotoxin production at 22°C and 37°C by environmental and human isolates from Scandinavia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 88: 287-291.
- KAPPERUD, G., T. NESBAKKEN, S. ALEKSIC y H.H. MOLLARET. 1990. Comparison of restriction endonuclease analysis and

- phenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates. J. Clin. Microbiol. 28:1125-1131.
- KAPPERUD, G. 1975. *Yersinia enterocolitica* in samll rodents from Norway, Sweden and Finland. Act. Pathol Mirobiol. Scand. Sect. B 85:129-135.
- KAPPERUD, G., E. NAMORK y H-J. SKARPEID. 1985^a. Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 47:561-566.
- KAPPERUD, G. y J. LASSEN. 1983. Relationship of virulence-associated autoagglutination to hamagglutinin production in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. Infect. Immun. 42:163-169.
- KAPPERUD, G., H.J. SKARPEID, R. SOLBERG y T. BERGAN. 1985^b. Outer membrane proteins and plasmids in different *Yersinia enterocolitica* isolated from man and animals. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 93:27-35.
- KAY, B.A., K. WACHSMUTH, P. GEMSKI, J.C. FEELEY, T.F. QUAN y D.J. BRENNER. 1983. Virulence and phenotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from humans in United States. J. Clin. Microbiol. 17:128-138.
- KAY, B.A., K. WACHSMUTH y P. GEMSKI. 1982. New virulence-associated plasmid in *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 15:1161-1163.
- KEKOMÄKI, R., K. GRANFORS, R. LEINO, K. PENTTINEN, P.-L. LINDSTRÖM y O. WAGER. 1983. Clinical correlates of circulating immune complexes in patients with recent yersiniosis. J. Infect. Dis. 148:223-229.
- KOUWATLI, K., V. BEJAR, A. RUIZ-BRAVO y A. RAMOS-CORMENZANA. 1979. Sensibility of *Yersinia enterocolitica* to several antimicrobial agents. Microbios Letters 11:137.
- KWAGA, J. y J.O. 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.
- LACHICA, R.V., D.L. ZINZ y W.R. FERRIS. 1984. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 46:272-275.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- LAIRD, W.J., y D.C. CAVANOUGH. 1980. Correlation of

- autoagglutination and virulence of yersiniae. *J. Clin. Microbiol.* 11:430-432.
- LARSON, J.H. 1979. The spectrum of clinical manifestations of infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:257-269.
- LASSEN, J. y G. KAPPERUD. 1986. Serotype-related HEp-2 cell interaction of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 52:85-89.
- LASSEN, J. 1972. *Yersinia enterocolitica* in drinking-water. *Scand. J. Dis.* 4:125-127.
- LE MINOR, L., A.M. CHALON y M. VERON. 1972. Recherches sur la presence de l'antigene comun des *Enterobacteriaceae* chez les *Yersinia*, *Levinea*, *Aeromonas* et *Vibrio*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 123B:761-765.
- LEE, W.H., P.P. McGRATH, P.H. CARTER y E.L. EIDE. 1977. The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. *Can. J. Microbiol.* 23:1714-1722.
- LEE, W.H. 1977. Two tween media for the isolation of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:215-216.
- LEVINE, M.M., J.B. KAPER, R.E. BLACK y M.L. CLEMENTS. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47:510-550.
- LEYVA, J. 1982. Determinación de los requerimientos nutritivos de *Yersinia enterocolitica*. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada.
- LEYVA, J. 1991. Aplicación de la técnica de inmunoblot al estudio serológico en brucelosis humana. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- LIAN, C.J., W.S. HWANG y C.H. PAI. 1987. Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 55:1176-1183.
- LIAN, C. y C.H. PAI. 1985. Inhibition of human neutrophil chemiluminescence by plasmid outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 49:145-151.
- LIDMAN, K., U. ERIKSSON, A. FAGRAENS y R. NORBERG. 1974. Antibodies against thyroid cells in *Yersinia enterocolitica* infection. *Lancet* 2:1449-1451.
- MAKI, M., T. VESIKARI, I. RANTALA, C. SUNDQVIST y P. GRONROOS. 1983. Pathogenicity of 42-44 Mdal plasmid positive and negative *Yersinia pseudotuberculosis* I and *Yersinia enterocolitica* 0:8 and 0:9 studied in the guinea pig eye

- model (Serény test). Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 91:241-244.
- MARTINEZ, R.J. 1989. Thermoregulation-dependent expression of *Yersinia enterocolitica* protein 1 imparts serum presistance to *Escherichia coli* K-12. Infect. Immun. 171:3732-3739.
- MARTINEZ, R.J. 1983. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 41:921-930.
- MAZIGH, D., J.M. ALONSO y H.H. MOLLARET. 1983. Simple methods for demonstration of diferential colony morphology of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 17:555-557.
- MAZZA, G., A.E. KARU y D.T. KINGSBURY. 1985. Immune response to plasmid- and chromosome-encoded *Yersinia* antigens. Infect. Immun. 48:676-585.
- MELTZER, M.S. y C.A. NACY. 1989. Delayed-type hypersensitivity and the induction of activated cytotoxic macrophages. p. 765-777. En W.E. PAUL (Ed.) "FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY". Raven Press, New York.
- METCALF, D. 1977. Neutrophil and macrophage colony formation by normal cells p. 57-98. En P. RENTCHNICK (ed.). "HEMOPOIETIC COLONIES". 1977. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.
- MICHIELS, T. P. WATTIAU, R. BRASSEUR, J.M. RUYSSCHAER, y G. CORNELIS. 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. Infect. Immun. 58:2840-2849.
- MILIOTIS, M.D., J. GALEN, J.B. KAPER y J.G. MORRIS, Jr. 1989. Development and testing of a synthetic oligonucleotide probe for the detection of pathogenic *Yersinia* strains. J. Clin. Microbiol. 27:1667-1670.
- MILIOTIS, M.D., J.G. MORRIS, S. CIANCIOSI, A. C. WRIGHT, P.K. WOOD y R.M. ROBINS-BROWNE. 1990. Identification of a conjunctivitis-associated gene locus from the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 58:2470-2477.
- MILLER, V.L. y S. FALKOW. 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect. Immun. 56:1242-1248.
- MILLER, V.L., J.B. BLISKA y S. FALKOW. 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the ail protein product. J. Bacteriol. 172:1062-1069.
- MILLER, V.L., J.J. FARMER III, W.E. HILL y S. FALKOW. 1989. The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. Infect. Immun. 57:121-131.

- MOLLARET, H.H. y E. THAL. 1974. *Yersinia*. p. 330-332. En R.E. Buchanan y N.E. Gibbons (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- MOLLARET, H.H. y P. DESTOMBES. 1964. Les germs X en pathologie humaine. *Press. Med.* 72:2913-2916.
- MOLLATER, H.H., H. LERCOVIER, y J.M. ALONSO. 1979. Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:174-184.
- MORS, V. y C.H. PAI. 1980. Pathogenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28:292-294.
- MULDER, B., T. MICHIELS, M. SIMONET, M.P. SORY y G. CORNELIS. 1989. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect. Immun.* 57:2534-2541.
- NESBAKKEN, T., G. KAPPERUD, H. SORUM y K. DOMMARSNES. 1987. Structural variability of 40-50 M¹ virulence plasmids from *Yersinia enterocolitica*. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B*, 95:167-173.
- NICOLLE, P., H.H. MOLLARET, y J. BRAULT. 1976. Nouveaux résultats sur la lysotypie de *Yersinia enterocolitica* portant sur plus de 4000 souches d'origines diverses. *Rev. Epidém. et Santé Publ.* 24:478
- NILEHN, B. 1969^a. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnose and occurrence in human acute enteric disease. *Acta Path. Scand. Suppl.* 206:1-48.
- NILEHN, B. y B. SJOSTROM. 1967. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in patients admitted to hospital because of suspected acute appendicitis. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 71: 77-78.
- NILEHN, B. 1969^b. Studies on *Yersinia enterocolitica* growth on various solid media at 37°C and 25°C. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 77:685-697.
- O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé). 1982. Les *Yersinioses*, p. 3. Rapports et études EURO. Bureau régional de l'Europe, O.M.S., Copenhague.
- OAKLEY B.R., KIRSCH D.R., MORRIS N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- PALREGAARD, A., F. ESPERSEN, O.M. JENSEN y M. SKURNIK. 1991^a. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adherence

- to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* 59:253-260.
- PAERREGAARD, A., F. ESPERSEN y M. SKURNIK. 1991^b. Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 99:226-232.
- PAI, C.H. y V. MORS. 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 19:908-911.
- PAI, C.H., V. MORS y T.A. SEEMAYER. 1980. Experimental *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbits. *Infect. Immun.* 28: 238-244.
- PAI, C.H. y L. DE STEPHANO. 1982. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35:605-611.
- PAYNE, S.M. 1980. Synthesis and utilization of siderophores by *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 143:1420-1424.
- PEDERSEN, K.B. 1979. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in the throat of swine. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:253-256.
- PEPE, J.C. y V. MILLER. 1990. The *Yersinia enterocolitica* *inv* gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* *invasin*. *J. Bacteriol.* 172:3780-3789.
- PERRY, R.D. y C.L. SAN CLEMENTE. 1979. Siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella sonnei* during iron deficiency. *J. Bacteriol.* 140:1129-1132.
- PERRY, R.D. y R.R. BRUBAKER. 1983. VWa⁺ phenotype of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 40:166-171.
- PERRY, R.D. y R.R. BRUBAKER. 1979. Accumulation of iron by *Yersinia*. *J. Bacteriol.* 137:1290-1298.
- PERRY, R.D., P.A. HARMON, W.S. BOWMER y S. STRALEY. 1986. A low Ca²⁺ response operon encodes the V antigen of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 54:428-434.
- PIERSON, D.E. y S. FALKOW. 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. 58:1059-1064.
- PILZ, D., T. VOCKE, J. HEFSEMANN y V. BRADE. 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype 03. *Infect. Immun.* 60:189-195.
- PORTNOY, D.A. y S. FALKOW. 1981. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J.*

- Bacteriol. 148:775-782.
- PORTNOY, D.A., I. WOLF-WATZ, I. BOLIN, A.B. BEEDER y S. FALKOW. 1984. Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 43:108-114.
- PORTNOY, D.A. y S. FALKOW. 1981. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 148:877-883.
- PORTNOY, D.A., S.L. MOSELEY y S. FALKOW. 1981. Characterization of plasmid and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect. Immun.* 31:775-788.
- PRPIC, K.J., R.M. ROBINS-BROWNE y R.B. DAVEY. 1985. *In vitro* assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 22:105-110.
- PRPIC, J.K., R.M. ROBINS-BROWNE y R.B. DAVEY. 1983. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. *J. Clin. Microbiol.* 18:486-490.
- RABSON, A.R., A.F. HALLETT y H.J. KOORNHOF. 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* 131:447-451.
- RAMOS CORMENZANA, A. 1979. Taxonomía bacteriana. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- RILEY, G. y 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., A.R. RABSON y H.J. KOORNHOF. 1979. Generalized infection with *Yersinia enterocolitica*, the role of iron. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:277-282.
- ROBINS-BROWNE, R.M., M.D. MILIOTIS, S. CIANCIOSI, V.L. MILLER, S. FALKOW y J.G. MORRIS, Jr. 1989. Comparison of DNA colony hybridization and other techniques for detection of virulence in *Yersinia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 27:644-650.
- ROBINS-BROWNE, R.M. y J.K. PRPIC. 1985. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 47:774-779.
- ROGERS, H.J. 1973. Iron binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 7:445-456.
- ROITT, I. 1984. Essential immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ROSQVIST, R., I. BOLIN y H. WOLF-WATZ. 1988. Inhibition of

- phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect. Immun.* 56:2139-2143.
- ROSQVIST, R. y H. WOLF-WATZ. 1986. Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathog.* 1:229-240.
- RUIZ-BRAVO, A. 1980. Contribución al estudio de la inmunopotenciación por microorganismos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- RUIZ-BRAVO, A., M. JIMENEZ-VALERA, S.M. ROMAN y A. RAMOS-CORMENZANA. 1986. Role of bone marrow in inflammatory response to experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice. *FEMS Microbiol. letters* 35:189-191.
- SCHIEMANN, D.A. y J.A. DEVENISH. 1980. Virulence of *Yersinia enterocolitica* determined by lethality in mongolian gerbils and by the Serény test. *Infect. Immun.* 29:500-506.
- SCHIEMANN, D.A., J.A. DEVENISH y S. TOMA. 1981. Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 32:400-403.
- SCHIEMANN, D.A. y J.A. DEVENISH. 1982. Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35:497-506.
- SCHIEMANN, D.A. 1979. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* 25:1298-1304.
- SCHLEIFSTEIN, J.I. y M.B. COLEMAN. 1939. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *P. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *New York State Journal of Medicine* 39: 1749-1753. Referido por: Swaminathan, B., M.C. Harmon y J.J. Mehlman. 1982. A review *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 52:151-183.
- SCHNAITMAN, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* 108: 545-552.
- SERENY, B. 1955. Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 2: 293-296. Referido por: Wachsmuth, K., B.A. Kay y K. Birkness. 1984. Diagnostic value of plasmid analyses and assays for virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2:219-228.
- SHAPIRO, A.L., E. VINUELA y J.V. MAIZEL. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26:815-820.

- SHAYEGANI, M., I. DEFORGE, D.M. McGLYNN y T. ROOT. 1981. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolates from human, animal, and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 14:304-312.
- SIPE, J.D. y D.L. ROSENSTREICH. 1981. Serum factors associated with inflammation. p. 411-429. En: J.J. OPPENHEIM, D.L. ROSENSTREICH y MICHAEL POTTER (Eds.) "CELLULAR FUNCTIONS IN IMMUNITY AND INFLAMMATION. Arnold, London.
- SKURNIK, M. 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect. Immun.* 47:183-190.
- SKURNIK, M., I. BOLIN, H. KEIKKINEN, S. PIHA y H. WOLF-WATZ. 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* 158:1033-1036.
- SODEINDE, O.A., A.K. SAMPLE, R.R. BRUBAKER y J.D. GOGUEN. 1988. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 56:2749-2752.
- STRALEY, S. y W.S. BOWMER. 1986. Virulence genes regulated at the transcriptional level of Ca^{2+} in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 51:445-454.
- STRALEY, S.C. y W.S. BOWMER. 1986. Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca^{2+} in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 51:445-454.
- STUART, S.J., J.K. PRPIC y R.M. ROBINS-BROWNE. 1986. Production of aerobactin by some species of the genus *Yersinia*. *J. Bacterio.* 166:1131-1133.
- SWARTZ, M.N. 1990. *Yersinia*, *Francisella*, *Pasteurella* and *Brucella*. p. 601-614. En: B.D. DAVIS, R. DULBECCO, H.N. EISEN y H.S. GINSBERG (Eds.) "MICROBIOLOGY". J.B. LIPPINCOTT COMPANY. Philadelphia.
- TOMA, S., G. WAUTERS, J.M. McCLURE, G.K. MORRIS y A.S. WEISSFELD. 1984. O:13a,13b, a new pathogenic serotype of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 20:843-845.
- UNE, T. y R.R. BRUBAKER. 1984. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersinia*. *J. Immunol.* 133:365-377.
- TOWBIN, H., T. STAHELIM y J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.

- UNE, T. 1977. Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. I. Experimental infection in rabbits. *Microbiol. Immunol.* 21:349-364.
- URSING, J., D.J. BRENNER, H. BERCOVIER, G.R. FAUNING, A.G. STEIGERWALT, J. BRAULT y H.H. MOLLARET. 1980. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formely called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Current Microbiol.* 4:213-218.
- VANDEPITTE, J. y G. WAUTERS. 1979. Epidemiological and clinical aspects of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:150-159.
- VANDEPITTE, J., G. WAUTERS y A. ISEBAERT. 1973. Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 2:111-.
- VESIKARI, T., C. SUNDQVIST y M. MAKI. 1983. Adherence and toxicity of *Yersinia enterocolitica* 0:3 and 0:9 containing virulence-associated plasmids for various cultured cells. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B* 91:121-127.
- VESIKARI, T., T. NURMI, M. MAKI, M. SKURNIK, C. SUNDQVIST, K. GRANFORS y P. GRONROOS. 1981. Plasmids in *Yersinia enterocolitica* serotypes 0:3 and 0:9. Correlation with epithelial cell adherence *in vitro*. *Infect. Immun.* 33:870-876.
- WACHSMUTH, K., B.A. KAY y K.A. BIRKNESS. 1984. Diagnostic value of plasmid analyses and assay for virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2:219-228.
- WACHTER, E. y V. BRADE. 1989. Influence of surface modulations by enzymes and monoclonal antibodies on alternative complement pathway activation by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 57:1984-1989.
- WAKE, A., M. MISAWA y A. MATSUI. 1975. Siderochrome production by *Yersinia pestis* and its relation to virulence. *Infect. Immun.* 12:1211-1213.
- WAUTERS, G. 1970. Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Ph. D. Thésis. Vander, Louvain, Belgique.
- WAUTERS, G., L. LE MINOR, A.M. CHALON y J. LASSEN. 1972. Supplément au schème antigénique de *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur* 122:951-956.
- WAUTERS, G., L. LE MINOR y A.M. CHALON. 1971. Antigènes somatiques et flagellaires de *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur* 120:631-642.
- WAUTERS, G., M. JANSSENS, A.G. STEIGERWALT y D.J. BRENNER. 1988.

- Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* formerly called *Yersinia enterocolitica* biogrups 3A and 3B. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:424-429.
- WAUTERS, G. 1979. Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. Contrib. Microbiol. Immunol. 5:249-252.
- WEBER, K. y M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224:4406-4412.
- WEINBERG, E.D. 1978. Iron and infection. Microbiol. Rev. 42:45-66.
- WILSON, H.D., J.B. McCORMICK y J.C. FEELEY. 1976. *Yersinia enterocolitica* infections in a 4-month-old infant associated with infection in household dogs. J. Pediatr. 89:767-769.
- WINBLAD, S. 1967. Studies on serological typing of *Yersinia enterocolitica*. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 187:115-116.
- WINBLAD, S. 1975. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infections. Scand. J. Infect. Dis. 7:191-195.
- WINBLAD, S. 1966. Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis. 1:1-16.
- WINBLAD, S. 1973^a. Studies on the O-serotypes of *Yersinia enterocolitica*. Contrib. Microbiol. Immunol. 2:27-37.
- WINBLAD, S. 1973^b. The clinical panorama of human *Yersiniosis enterocolitica*. Contrib. Microbio. Immunol. 2:129-132.
- WOLF-WATZ, H., D.A. PORTNOY, I. BOLIN y S. FALKOW 1985. Transfer of the virulence plasmid of *Yersinia pestis* to *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 48:241-243.
- WOOLEY, R.E., E.B. SHOTTS y J.W. McCONNEL. 1980. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from selected animal species. Am. J. Veter. Res. 41:1667-1668.
- YANAGAWA, Y., T. MARUYAMA y S. SAKAI. 1978. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from apparently healthy dogs and cats. Microbiol. Immunol. 22:643-646.
- YOTHER, J. y J.D. GOGUEN. 1985. Isolation and characterization of Ca²⁺-blind mutants of *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 164:704-711.
- ZALESKA, M., K. LOUNATMAA, M. NURMINEN, W. WAHLSTRÖM y P.H. MÄKELÄ. 1985. A novel virulence-associated cell surface

structure composed of 47-kdal protein subunits in *Yersinia enterocolitica*. EMBO J. 4:1013-1018.

ZINK, D.L., J.C. FEELEY, J.G. WELLS, C. VANDERZANT, J.C. VICKERY, W.D. ROOF y G.A. O'DONOVAN. 1980. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. Nature 282:224-226.

ZINK, D.L., J.C. FEELEY, J.G. WELLS, C. VANDERZANT, J.C. VICKERY y G.A. O'DONOVAN. 1978. Possible plasmid mediated virulence in *Yersinia enterocolitica*. Transactions of Gulf Coast Molecular Biology Conference 3:155-162.