

IDENTIFICACION DE ENTEROCOCOS EN HIGADOS DE BROILERS¹

Por B. Sáenz Pérez
M.^a C. Gutiérrez
A. García Díaz

Los enterococos pueden definirse como estreptococos incluidos en el grupo D de Lancefield que cumplen las condiciones señaladas por SHERMAN (1937). Su presencia en el aparato digestivo de los animales y del hombre ha sido señalada en múltiples ocasiones, sobre todo en el intestino que constituye su habitat natural (GANT y colaboradores, 1943; RAIBAUD, 1958; FERRARO, 1960; ROGERS y SARLES, 1964, etc.). Se han encontrado también como agentes contaminantes en diversos alimentos y equipos de las fábricas elaboradas de alimentos, estando implicados en ciertos brotes de intoxicaciones alimenticias (CARY, *et al.*, 1938; OSLER y colaboradores, 1948; RICHARDS y WHITE, 1949; ESSELEN y LEVINE, 1957; HOBBS, 1964; MASSIDA y MOLLE, 1964; MARCATO, 1964, etc.).

Al estudiar el contenido salmonelósico de diferentes tipos de carne, en un trabajo en vías de realización, hemos encontrado con cierta frecuencia estreptococos fecales en el hígado de broilers expuestos a la venta tras haber pasado la correspondiente inspección veterinaria.

En la presente publicación recogemos los resultados obtenidos utilizando medios de cultivo que contienen acetato de talio o azida sódica, sustancias muy selectivas para los enterococos; se compara su eficacia para la identificación y recuento total y finalmente se señalan las especies encontradas.

MATERIAL Y METODOS

Hígados.

Proceden de animales expuestos a la venta en carnicerías y supermercados, en cuyos locales se obtuvieron al azar las muestras objeto de este trabajo.

Con ayuda de pinzas y tijeras estériles se separan de la canal y se pasan, con la máxima asepsia posible, a frascos de vidrio de boca ancha provista del correspondiente tapón a rosca metálico, que habían sido previamente esterilizados en la estufa a 260° C durante dos horas.

¹ Trabajo realizado con una Ayuda concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia con cargo al crédito para el Fomento de la Investigación en la Universidad.

Se llevan inmediatamente al laboratorio y, o se prepara inmediatamente la muestra, o se conserva en frigorífico a 1-2° C durante veinticuatro horas como máximo.

Preparación de las muestras.

De cada hígado se prepara un homogeneizado en agua destilada estéril (10/100) con ayuda de un homogeneizador MSE. A partir del mismo se obtienen las correspondientes diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000.

Medios de Cultivo.

Se han utilizado los de SLANETZ y BARTLEY (1957) con azida sódica y cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazol («Bacto-mm-Enterococcus Agar»), el de BARNES (1956) con acetato de talio-glucosa y el de KENNER y colaboradores (1961), modificado por ROGERS y SARLES (*loc. cit.*). Todos los componentes de los medios y reactivos empleados en este trabajo proceden de Difco Laboratories, Michigan, USA.

Recuento y Aislamiento.

A partir de las diluciones antes indicadas se siembra un ml por placa en cada uno de los medios citados. De cada dilución se sembraron tres placas en los diferentes medios de cultivo, cuya superficie había sido previamente desecada en la estufa a 37 ° C durante 48 horas, de acuerdo con el proceder descrito por HENTGES y FULTON (1960).

La incubación se realiza a 37 ° C durante cuarenta y ocho horas y se procede inmediatamente al recuento de las colonias; las que se encuentran mejor aisladas, tras comprobar su pureza al microscopio, se emplean como inóculo para sembrar tubos inclinados de agar-triptosa-extracto de levadura, que se incuban veinticuatro horas a 37 ° C y después se conservan en frigorífico a 4 ° C para ulteriores estudios.

Identificación.

Se basa en los criterios de SHERMAN (1937): 1) Crecimiento en caldo de triptosa-extracto de levadura a 10 y 45 ° C; 2) desarrollo en este mismo medio a un pH de 9,6; 3) crecimiento en presencia de 6,5 % de cloruro sódico; 4) multiplicación en el caldo citado tras una incubación de media hora a 60 ° C y 5) desarrollo en leche descremada con una concentración de azul de metileno de 0,1 %.

Otras pruebas empleadas en la identificación, después de incubar a 37 ° C, fueron las siguientes: a) Reducción de la leche tornasolada (BURNETT *et al.*, 1957) b) hidrólisis de la gelatina (*Ibidem*) en un medio que contiene 2 % de triptosa, 0,5 % de cloruro sódico, 0,25 % de fosfato dipotásico, 0,3 % de extracto de levadura, 1,5 % de agar y 0,4 % de gelatina (pH = 7,2); reducción del telurito potásico en leche descremada (1/2.500); reducción del cloruro de tetrazol en el medio de Barnes (*loc. cit.*) a pH 6,0 y e) hemólisis en este mismo medio al que se adiciona sangre (5 % en volumen).

Finalmente con todas las colonias se estudió su poder fermentador frente a la L (—)-arabinosa, manita, sorbosa, melibiosa, melicitosa y glicerina, que se adicionaban a una concentración del 0,5 % a caldo de peptona (1 %), empleando como indicador púrpura de bromocresol. La producción de ácido se estimaba tras siete días de incubación a 37 ° C.

Todos los enterococos aislados se sometieron al tests de Cooper y Ramdan (1956) frente al calor y telurito potásico.

En total se han estudiado 480 muestras.

RESULTADOS Y DISCUSION

En 235 hígados, de todos los examinados, se ha encontrado un elevado número de estreptococos del grupo D de Lancefield, es decir, en el 48,9 % aproximadamente de las muestras examinadas, lo que demuestra un elevado índice de contaminación fecal posiblemente a partir del material entérico-estercoráceo, bien durante el escaldado-desplumado de las aves, o durante su evisceración y lavado posterior.

En la tabla I se comparan los recuentos obtenidos en dos medios de cultivo diferentes mediante siembra superficial y profunda. En los dos medios de cultivo se aprecia un mayor recuento con la primera de las técnicas señaladas, que además origina colonias de mayor tamaño, lo que facilita su conteo y su diferenciación, atendiendo a la reducción del cloruro de trifenil-tetrazol del medio. Con cualquiera de ambos procedimientos el medio de Slanetz y Bartley da recuentos más altos.

Al comparar los tres medios (ver tabla II) las diferencias observadas no son muy manifiestas, siendo de destacar el predominio de los tipos fuertemente reductores del cloruro de trifeniltetrazol, lo que se aprecia por la producción de colonias de intenso color rojo.

TABLA I

Influencia del método de siembra sobre el recuento de enterococos en dos medios selectivos de cultivo.

Medio de	Enterococos / gram. de hígado ¹	
	Siembra superficial	Siembra profunda
Slanetz y Bartley	495	474
Kenner y colaboradores	470	448

¹ Las cifras obtenidas son la media del recuento en diez placas.

TABLA II

Recuento enterocócico en tres medios de cultivo a partir de hígado de broilers

Tipo de recuento	Medio de	Enterococos / gram. de hígado ¹
Total	Slanetz y Bartley	474
	Barnes	510
	Kenner y colaboradores	385
Reductores débiles del TTC ²	Slanetz y Bartley	54
	Barnes	52
	Kenner y colaboradores	23
Reductores fuertes del TTC	Slanetz y Bartley	412
	Barnes	460
	Kenner y colaboradores	358

¹ Las cifras obtenidas son la media del recuento en 8 placas.

² Cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazol.

La identificación de las colonias aisladas de los tres medios empleados sugiere pequeñas diferencias en su poder selectivo (Tabla III). El *Streptococcus faecalis* y su variedad *zymogenes* representan del 47 al 57 % de todos los tipos aislados, seguidos de *Str. durans* y formas atípicas del mismo (6,2-31 % y 34,2-45 % respectivamente); las cepas restantes son *Str. faecium* atípicos que se diferencian del prototipo en su comportamiento frente a uno o más azúcares. En ninguno de los medios se aisló *Streptococcus liquefaciens*.

Según puede apreciarse en la tabla IV, del 32,3 % al 59,3 % de los enterococos aislados sobreviven a una temperatura de 63 ° C durante 30 minutos; sin embargo prácticamente ninguno fue capaz de crecer al resembrarlos en leche descremada con una concentración de telurito potásico de 1/2.500. Las cuatro especies que sobrevivieron a este test se identificaron como *Streptococcus faecalis*.

HENTGES y FULTON (1960) describieron una técnica de inoculación superficial que les permitió diferenciar entre *Salmonella* y *Shigella*; el mismo procedimiento en combinación con un medio selectivo adecuado permitió a ROGERS y SARLES (*loc. cit.*) el recuento y diferenciación de los enterococos del tracto digestivo de las ratas. Como ya hemos indicado tal proceder puede utilizarse con pleno éxito en la diferenciación y conteo de los enterococos del hígado de las aves.

Aunque RAIBAUD y colaboradores (1961) consiguieron mejores recuentos con el medio de Slanetz y Bartley que con los otros dos utilizados en el presente experimento, ni ROGERS y SARLES, ni nosotros hemos encontrado diferencias ostensibles.

TABLA III

Especies de enterococos aisladas de hígado de broilers en tres medios selectivos.

Especie o variedad	Tantos por ciento en medio de		
	Salanetz-Bartley	Barnes	Kenner <i>et al.</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	54,3	44,0	45,0
<i>Str. faecalis</i> atípicos ¹	3,1	7,5	8,0
<i>Str. faecalis</i> , var. <i>zymogenes</i>	1,6	13,0	2,0
<i>Str. faecalis</i> , var. <i>liquefaciens</i>	0,0	0,0	0,0
Suma	59,0	64,0	55,0
<i>Streptococcus durans</i>	8,3	6,2	31,0
<i>Streptococcus durans</i> atípicos	29,6	28,0	14,0
Suma	37,9	34,2	45,0
<i>Streptococcus faecium</i>	0,0	0,0	0,0
<i>Streptococcus faecium</i> atípicos	4,1	1,8	0,0
Suma	4,1	1,8	0,0
TOTAL	100,0	100,0	100,0

¹ Difieren de las formas típicas en la fermentación de uno o más azúcares.

La dificultad que supone la perfecta identificación de las especies de estreptococos del grupo D de Lancefield, ha sido puesta de manifiesto por cuantos se han ocupado de este problema (SHATTOCK, 1955; PAPAVASSILIOU, 1962; DEIBEL y colaboradores, 1963, etc.). El porcentaje de especies atípicas que hemos encontrado (diferentes de las típicas en su comportamiento frente a ciertos azúcares) y el hecho de que el mayor número corresponda a las especies *Str. durans* y *faecium*., confirman los resultados de los investigadores últimamente citados, puesto que *Str. durans* se diferencia de *Str. faecium* únicamente por no fermentar ni la L (—)-arabinosa, ni el manitol. Nada tiene de extraño que Deibel y colaboradores (*loc. cit.*) defiendan que el *Str. durans* se considere como una variedad de *Str. faecium*.

Si admitimos con COOPER y RAMADAN (1955) que los estreptococos fecales de origen humano se diferencian de los de origen animal por su termorresistencia y capacidad de desarrollarse posteriormente en presencia de telurito potásico, hemos de concluir que los aislados en este trabajo son de origen animal, lo que parece confirmar lo que antes hemos señalado: que la contaminación del hígado ocurriría durante el escaldado-desplumado o durante la evisceración y lavado posterior de la canal a partir del contenido intestinal de las aves. Los experimentos de SHAPIRO y SARLES (1949) están así mismo en favor de este origen entérico.

Digamos para terminar que la presencia de estreptococos fecales en el hígado, y posiblemente en otras regiones orgánicas, de las aves que normalmente abastecen nuestro comercio, sin que la viscera presente signo alterativo alguno, podría dar lugar, de no mantenerse a temperaturas inferiores a los 5 ° C durante todo su ciclo comercial a un elevado recuento y posiblemente a brotes de toxi-infecciones alimenticias, como ya se ha comprobado en más de una ocasión (HOBBS, 1954). De aquí la necesidad de observar escrupulosamente las normas higiénicas exigibles a mataderos, carnicerías, etc.

TABLA IV

Tolerancia al calor y telurito sódico de los enterococos aislados de hígado de broilers

Medio de	Cepas estudiadas	Termorresistentes (63° C durante 30 minutos) ¹	Resistentes al calor y telurito potásico	
			Identificación	
Slanetz y Bartley	31	10 (32,3)	1	<i>Str. faecalis</i>
Barnes	32	13 (40,6)	1	<i>Str. faecalis</i>
Kenner <i>et al.</i>	32	19 (59,3)	2	<i>Str. faecalis</i>

¹ Las cifras entre paréntesis indican porcentajes.

RESUMEN

Se hace un estudio de los estreptococos del grupo D de Lancefield encontrados en hígados de broilers expuestos a la venta tras haber pasado la correspondiente inspección veterinaria.

El aislamiento e identificación de estos gérmenes, basado en los criterios de SHERMAN, se llevó a cabo en los medios de Slanetz y Bartley, Barnes, y Kenner y colaboradores, cuya eficacia se compara y discute.

Entre las especies aisladas predomina *Streptococcus faecalis* y su variedad *zymogenes*, seguidas de *Str. durans* y *Str. faecium*. En ninguno de los medios se aisló la variedad *liquefaciens* de *Str. faecalis*.

RESUME

On a fait une étude sur les Streptocoques du groupe D de Lancefield trouvés dans le foie de broilers exposés à la vente après avoir été examinés par le Vétérinaire.

L'isolement et l'identification de ces germes, basés sur le critère de SHERMAN, furent effectués dans les milieux de Slanetz et Bartley, de Barnes, et de Kenner et ses collaborateurs, dont l'efficacité est comparée et discutée.

Parmi les espèces isolées, les plus nombreuses sont le *Streptococcus faecalis* et sa variété *zymogenes*, suivies par le *Streptococcus durans* et le *Streptococcus faecium*. La variété *liquefaciens* du *Streptococcus faecalis* ne fut isolée dans aucun des susdits milieux.

SUMMARY

A study has been carried out on the Streptococci of group D of Lancefield encountered in livers of broilers put into the market after having been inspected by the Veterinarian.

The isolation and identification of these organisms based on SHERMAN's criterium were carried out in Slantz and Barley's Medium, Barner's Medium and Renner et al. 's Medium, the efficiency of which is compared and discussed.

Streptococcus faecalis and its variety *zymogenes* predominate among the species isolated, followed by *Streptococcus durans* and *Streptococcus faecium*. The variety *liquefaciens* of *Streptococcus faecalis* was not isolated in any Medium.

BIBLIOGRAFIA

- BARNES, E. M., 1956, *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 57-68.
BURNETT, G. W., Pelczar, M. J. y Conn, H. J., 1957, *Soc. Am. Bacteriols., Manual of Microbiological Methods.*, págs. 37-63, McGraw Hill Book, Co., New York.
CARY, W. E., DACK, G. M. y DAVISON, E., 1938, *J. Infect. Dis.*, **62**, 88-91.
COOPER, K. E. y RAMADAN, F. M., 1955, *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 180-190.
DEIBEL, R. H., LAKE, D. E. y NIVEN, C. F., 1963, *J. Bacteriol.*, **86**, 1.275-1.282.
ESSELEN, W. B. y LEVINE, A. S., 1957, *Coll. Agric. Bull.* **493**, University of Massachusetts.
FERRARO, F. M., 1960, *Studies upon the distribution and identifications of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium*. Tesis de Ph. D., University of Southern California, Los Angeles, USA.
GANT, O. K., RANSOME, B., MCCOY, E y ELVENHJEN, C. A., 1943, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **52**, 276-279.
HENTGES, D. J. y FULTON, M., 1960, *J. Bacteriol.*, **79**, 457-458.
HOBBS, B. C., 1954, *Food Sci. Abstrs.*, **26**, 601-612.
KENNER, B. A., CLARK, H. F. y KABLER, P. W., 1960, *Am. J. Public Health.*, **50**, 1.553-1.559.
MARCATO, A., 1964, *Clin. Europea*, **3**, 23-32.
MASSIDDA, A. y MOLLE, A., 1964, *Boll. Ist. Sieroter. Milanese*, **43**, 384-392.
OSLER, A. G., BUCHBINDER, L. y STEFFEN, G. I., 1948, *Proc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 456-459.
PAPAVASSILIOU, J., 1962, *Appl. Microbiol.*, **10**, 65-69.
RAIBAUD, P., 1958, *Ann. Nutr. Aliment.*, **12**, 135-151.
———, P., CAULET, M. GALPIN, J. V. y MOQUOT, G., 1961, *J. Appl. Bacteriol.*, **24**, 285-306.
RICHARDS, T. y WHITE, H. R. B., 1949, *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.*, **949**, 61-65.
ROGERS, C. G. y SARLES, W. B., 1964, *J. Bacteriol.*, **88**, 965-973.
SHAPIRO, S. K. y SARLES, W. B., 1949, *J. Bacteriol.*, **58**, 531-544.
SHATTOCK, P. M. F., 1955, *Ann. Inst. Pasteur Lille.*, **7**, 95-100.
SHERMAN, J. M., 1937, *Bacteriol. Rev.*, **1**, 3-97.
SLANETZ, L. W. y BARTLEY, C. H., 1957, *J. Bacteriol.*, **74**, 591-595.