

ANDRZEJ SKOCZEK, JERZY MIERZEJEWSKI

Izolowanie szczepów *Clostridium botulinum* B z konserw mięsnych zbombażowanych

Z Ośrodka Naukowo-Badawczego Służby Weterynaryjnej w Puławach

Przyjęte w technologii konserw żywnościowych kryteria sterylizacji nie gwarantują całkowitego zniszczenia najbardziej ciepłopornych endospor drobnoustrojów, które w sprzyjających warunkach są zdolne do kiełkowania.

Najczęstszym sprawcą bakteryjnego psucia się konserw mięsnych są laseczki beztlenowe należące do gatunków *C. sporogenes* i *C. perfringens*. Notuje się o wiele mniej przypadków występowania innych gatunków, w tym i *C. botulinum*.

Dotychczas dane o *C. botulinum* opierają się głównie na statystyce zatruc ludzi lub zwierząt po spożyciu zakażonej żywności. Na przykład w latach 1973—74 stwierdzono w USA 21 ognisk zatrucia ludzi toksyną botulinową po spożyciu żywności puszkowanej i konserwowanej przez apertyzację (5), natomiast w Polsce tylko w 1974 roku naliczono 30 takich ognisk. Mało jest poznana częstotliwość występowania *C. botulinum* w konserwach mięsnych uległych bakteryjnemu zepsuciu w porównaniu do innych laseczek beztlenowych. Insalata i wsp. (6), badając 400 próbek żywności konserwowanej, stwierdzili w jej przetrwalniki *C. botulinum* B. Lynt i wsp. (9) wykazali *C. botulinum* B w 30 puszkach konserw roślinnych, znajdujących się w handlu w USA w latach 1973—74.

Celem obecnej pracy było przebadanie w kierunku obecności laseczek botulinowych konserw mięsnych, które uległy zbombażowaniu w okresie od 1 do 6 lat przechowywania. Równocześnie postanowiono dokonać charakterystyki wyizolowanych szczepów ze szczególnym uwzględnieniem toksynogenezy, właściwości hodowlanych, biochemicznych i ciepłoporności endospor.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. 1023 puszek różnych gatunków konserw mięsnych, uległych zbombażowaniu w różnym okresie magazynowania.

2. Podłoża bakteryjnych namnażających: VF i Wrzoska.

3. Innych podłoży bakteryjnych: wg Zeisslera, Willisa Hobbs, z tryptofanem, do określania redukcji azotanów, żelatyny, ściętej surowicy, mleka lakmusowego oraz rzędu cukrów: glukozy, laktozy, maltozy, sacharozy, galaktozy, salicyny i glicerolu.

4. Szczepu muzealnego *C. botulinum* B nr 1162 (nr kolekcji PZH).

5. Zestawu surowic przeciwbobotulinowych diagnostycznych (typ A — seria 10173, typy B, E i F — seria 21075) produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

6. Myszek białych o ciężarze ciała 18—20 g o nieustalonej linii hodowlanej.

Izolację i identyfikację laseczek botulinowych przeprowadzono według metodyki ogólnie przyjętej przez większość autorów (4, 10, 13, 18). Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym przeprowadzono według metody opisaną przez Albrycht i wsp. (2) oraz Porębską i wsp. (15). Ciepłoporność endospor określano według metody podanej przez Robertsa (16).

Wyniki i omówienie

Z ogólnej liczby 1023 puszek konserw mięsnych zbombażowanych wyizolowano 430 szczepów beztlenowców przetrwalnikujących, z których aż 366 posiadało cechy morfologiczne, hodowlane i biochemiczne odpowiadające grupie *C. sporogenes* i *C. botulinum*. Spośród nich u 9 szczepów stwierdzono wytwarzanie neurotoksyny botulinowej w próbie biologicznej na podstawie charakterystycznego przebiegu toksoinfekcji i padnięć myszek białych.

Aktywność toksynogenną hodowli tych szczepów namnażanych przez 48 godzin w temperaturze 30°C na podłożu Wrzoska bez glukozy oraz swoistość toksyny w odczynie zobojętnienia przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Aktywność toksyny wytwarzanej przez 9 szczepów botulinowych oraz swoistość zobojętniania surowicami przeciwbobotulinowymi diagnostycznymi

Nr szczepu	Aktywność toksyny (liczba DLM w 1 ml)	Swoistość zobojętniania surowicami przeciwbobotulinowymi diagnostycznymi:			
		A	B	E	F
1	150	—	+	—	—
2	1000	—	+	—	—
3	1000	—	+	—	—
4	1000	—	+	—	—
5	1000	—	+	—	—
6	1000	—	+	—	—
7	1000	—	+	—	—
8	100	—	+	—	—
9	1000	—	+	—	—

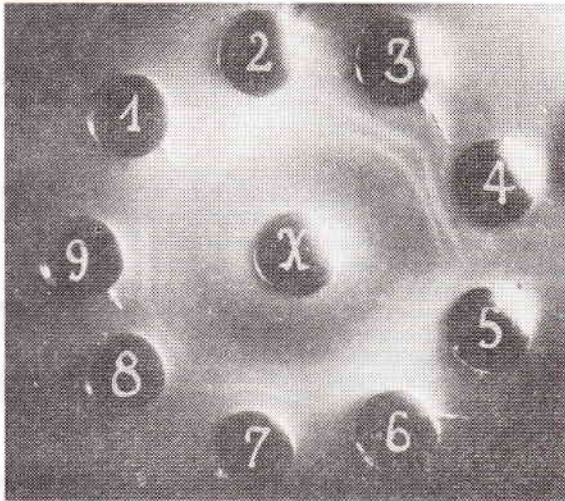
Objaśnienia: + myszka przeżyła, — myszka padła.

Jak wynika z tab. 1, hodowle szczepów wytwarzały toksynę o aktywności rzędu od 100 do 1000 DLM w 1 ml dla myszek. Próby biologiczne z wielokrotnych pasażów tych szczepów potwierdziły znaczną stabilność toksynogenezy.

W odczynie zobojętnienia z surowicami przeciwbobotulinowymi diagnostycznymi A, B, E i F stwierdzono zobojętnienie toksyn tych szczepów przez surowicę diagnostyczną dla typu B.

Wyniki odczynu precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym supernatantów hodowli tych szczepów z surowicą przeciwbobotulinową diagnostyczną dla typu B przedstawiono na ryc. 1.

Jak wynika z ryc. 1, w odczynie precypitacji dyfuzyjnej wykazano homologiczne linie precypitacyjne między supernatantami wszystkich hodowli botulinowych, a surowicą przeciwbotulinową diagnostyczną B. Nie uwidoczniono na rycinie odczyny kontrolne wykonane z surowicami przeciwbotulinowymi diagnostycznymi dla typów A, E i F nie wykazały obecności żadnych linii precypitacyjnych.



Ryc. 1. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym między surowicą przeciwbotulinową diagnostyczną B (X) a supernatantami hodowli badanych szczepów (1-9)

Uzyskane wyniki są potwierdzeniem wcześniejszych badań własnych (14) i innych autorów (2, 17), wskazujących na obecność charakterystycznych dla toksyny botulinowej dwóch linii precypitacyjnych o stałym umiejscowieniu i intensywności.

W hodowlach na podłożu Wrzoska bez glukozy, po 18 godzinach namnażania w temperatu-

rze 30°C, wyizolowane szczepy botulinowe rosły w postaci jednolitego zmętnienia, opadającego na dno probówki w miarę przedłużania inkubacji.

W preparatach mikroskopowych stwierdzono typowe laseczki barwiące się G⁺, a w starszych hodowlach również G⁻ — oraz dość liczne owalne endospory, ułożone podbiegunowo i rozszerzające sporangium. W hodowli obserwowanej w kropli wiszącej i w preparacie tuszowym nie wykazano obecności ruchu i otoczek.

Na powierzchni agaru z krwią, po 48 godzinnej inkubacji w temperaturze 37° w warunkach beztlenowych uzyskanych przy pomocy metody pirogalolowej, szczepy wytwarzały kolonie wypukłe, o brzegach lekko strzępiastych z wąską strefą hemolizy alfa.

Cechy biochemiczne oraz ciepłooporność szczepów botulinowych przedstawiono w tab. 2.

Stwierdzono, że wszystkie szczepy fermentowały glukozę i maltozę, rozrzedzały żelatynę i ściętą surowicę oraz wykazywały mierną proteolizę mleka lakmusowego, nie wytwarzały indolu, nie redukowały azotanów do azotynów, nie wytwarzały lecytynazy. Szczepy nr 1 i 2 fermentowały galaktozę, a szczep nr 4 glicerol. Szczepy nr 1, 2, 4 i 5 wytwarzały lipazę. Nie wytwarzanie lecytynazy przez badane szczepy botulinowe ma potwierdzenie we właściwościach biochemicznych *C. botulinum* podanych przez Bergey'a (3) i Smitha (19). Należy tu podkreślić, że w większości polskich podręczników mikrobiologii jest mylnie wymieniana właściwość wytwarzania lecytynazy przez *C. botulinum*.

Endospory badanych szczepów botulinowych cechowały się znaczną ciepłoopornością, co tłumaczy ich obecność w przemysłowo produkowanych konserwach mięsnych. Dane z licznych źródeł piśmiennictwa wskazują, że endospory szczepów botulinowych są zdolne do przeżycia

Tab. 2. Cechy biochemiczne szczepów i ciepłooporność endospor *Clostridium botulinum* B wyizolowanych z konserw mięsnych zbombardowanych

Nr szczepu	Aktywność sacharolityczna							Aktywność proteolityczna			Inne cechy biochemiczne		Aktywność enzymatyczna		Ciepłooporność endospor (czas w minutach w temp. 100°C)
	glukoza	laktoza	maltoza	sacharoza	galaktoza	glicerol	salicyna	żelatyna	mleko	ścięta surowica	indol	reduk. azotan.	lecytynaza	lipaza	
1	+	-	+	-	+	-	-	++	P	+	-	-	-	+	540
2	+	-	+	-	+	-	-	++	P	+	-	-	-	+	600
3	+	-	+	-	-	-	-	++	P	+	-	-	-	+	540
4	+	-	+	-	-	+	-	++	P	+	-	-	-	+	540
5	+	-	+	-	-	-	-	++	P	+	-	-	-	+	600
6	+	-	+	-	-	-	-	++	P	+	-	-	-	-	600
7	+	-	+	-	-	-	-	++	P	+	-	-	-	-	480
8	+	-	+	-	-	-	-	++	P	+	-	-	-	-	540
9	+	-	+	-	-	-	-	+	P	+	-	-	-	-	420

Objaśnienie: P = proteoliza.

przez 3—5 godzin w temperaturze 100°C (7, 8, 11, 12, 19). Wyniki własnych obserwacji świadczą jednoznacznie, iż endospory niektórych z badanych szczepów wykazywały co najmniej dwukrotnie większą ciepłooporność. Czas niezbędny do zabicia hodowli zawierającej endospory, pod wpływem temperatury 100°C określono na 420 minut dla szczepu nr 9 i aż 600 minut dla szczepów nr 2, 5 i 6. Dla porównania, czas niezbędny do zabicia endospor szczepu kontrolnego *C. botulinum* B nr 1162, w tej samej temperaturze wyniósł 120 minut.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na stosunkowo wysoki odsetek występowania laseczek botulinowych w konserwach produkcji przemysłowej, uległych bakteryjnemu zepsuciu. Uzyskane wyniki korespondują z danymi statystycznymi (1), dotyczącymi częstotliwości występowania zatruc botulinowych w Polsce i wskazują na ciągle niebezpieczeństwo tych zatruc, a w konsekwencji na konieczność bardziej rygorystycznego przestrzegania parametrów sterylizacji konserw żywnościowych.

Piśmiennictwo

1. Anusz Zb.: Prz. epid. 30, 89, 1976.
2. Albrycht H., Rymkiewicz D.: Post. Hig. 16, 881, 1962.
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Wyd: 8, Williams, Wilkins Comp., Baltimore, 1974.
4. Cygan Z.: Drobnoustroje beztlenowe rodzaju Clostridium. Materiały z sesji specjalistycznej, Lublin, 1968.
5. Horwitz M. A., Hughes J. M.: J. infect. Dis. 134, 306, 1976.
6. Insalata N. F., Witzeman S. J., Fredericks G. J., Sunga F. C. A.: Appl. Microbiol. 17, 542, 1969.
7. Jacobs M., Gerstein M.: Handbook of microbiology. D. van Nostrand Comp., Inc., Princeton, New Jersey.
8. Ito K. A., Seeger M. L., Bohrer C. W., Denny C. B., Bruch M. K.: The thermal and germicidal resistance of Clostridium botulinum types A, B and E spores. Jap. Conference Toxic Microorganisms 410, 1970.
9. Lynt R. K., Kautter D. A., Read R. B.: J. Milk Fd Technol. 38, 546, 1975.
10. Matras J., Mierzejewski J.: Charakterystyka szczepów z rodz. Clostridium wyizolowanych z jez. mazurskich w ogniskach zatruc botulinowych. Mat. konf.: Nowoczesne kierunki i metody badań mikrobiologii żywności, Szczecin 236, 1976.
11. Matsuda N., Matsumoto N., Ushizawa S., Kakegawa Y., Kato H., Nishida S.: J. Fd Hyg. Sci. Jap. 16, 253, 1975.
12. Merchart I. A., Packer R. A.: Veterinary Bacteriology and Virology. Wyd. 5. Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1956.
13. Mierzejewski J.: Botulizm zwierząt domowych i dzikich. PWRIL, 1969.
14. Mierzejewski J., Skoczek A.: Med. dośw. 29, 211, 1977.
15. Porębska A., Zemburowa K.: Post. Hig. 27, 1, 1973.
16. Roberts T. A.: J. appl. Bact. 31, 133, 1968.
17. Rymkiewicz D., Albrycht H.: Med. dośw. 17, 291, 1965.
18. Rymkiewicz D., Switalska A., Trembowler P.: Wyd. Metod. PZH nr 1, 1972.
19. Smith I.: The pathogenic anaerobic bacteria. Wyd. 2. Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois.

Adres autora: dr Andrzej Skoczek, ul. Czartoryskich 13 m 14, 24-100 Puławy.

Скочек А., Межеевский Е. — Изолирование штаммов Clostridium botulinum В из мясных консервов, подвергшихся бомбажу.

Бактериологическому исследованию подвергли 1023 банки различных видов мясных консервов, подвергшихся бомбажу во время складирования. Из исследуемых консервов изолировали 430 штаммов анаэробов, образующих споры, из чего у 9 штаммов констатировали образование ботулинового нейротоксина с активностью порядка 100—1000 DLM в 1 мл для мышек. Биологические пробы из многократных пассажей этих штаммов подтвердили значительную стабильность токсиногенеза. Определили культурные, биохимические свойства и теплоустойчивость токсических штаммов.

Skoczek A., Mierzejewski J. — Isolation of Clostridium botulinum B strains from concaved tins of meat.

A total of 1023 tins of meat of various kinds, which were concaved during storage were subjected to bacteriological examinations. From the tins examined 430 strains of spore anaerobes were isolated, of which 9 strains were found to produce botulin neurotoxin with an activity of the order from 100 to 1000 DLM in 1 ml for mice. Biological tests from multiple passages of these strains have confirmed a considerable stability of toxycogenesis. Biochemical and cultivation properties and thermoresistance of the toxic strains were determined.

SANGSTER N. C., WHITLOCK H. V., KELLY J. D., GUNAWAN M., HALE C. A.: Efektywność fenbendazolu w dawce pojedynczej i w dawkach podzielonych w stosunku do postaci dojrzałych trychostrongylidów owiec opornych na benzimidazol. (The effect of single and divided dose administration on the efficacy of fenbendazole against adult stages of benzimidazole resistant sheep trichostrongylids). Res. vet. Sci. 26, 85—89, 1979 (1).

Efektywność fenbendazolu w stosunku do opornych na benzimidazol szczepów Haemonchus contortus i Trichostrongylus colubriformis przebadano na owcach zakażonych doświadczalnie. 2,5% roztwór leku podawano do zwązca jednorazowo w dawce 2,5; 5,0 lub 7,5 mg/kg wagi ciała względnie pięciokrotnie w odstępach jednodniowych w dawce 0,5; 1,0 lub 1,5 mg/kg wagi ciała. W oparciu o wyniki analizy statystycznej stwierdzono statystycznie znamienne różnice w przypadku H. contortus w zależności od sposobu dawkowania fenbendazolu. Efektywność fenbendazolu w dawkach podzielonych (0,5 lub 1,5 mg/kg) była znacznie niższa w porównaniu do dawki pojedynczej w przypadku T. colubriformis. Fenbendazol w dawce 5,0 mg/kg obniżał liczbę T. colubriformis o 24,2%, zaś w dawce podzielonej nie był zupełnie efektywny.

WOODS R. D.: Odpowiedź humoralna i komórkowa u prosiąt eksponowanych na zakażenie wirusem zakaźnego zapalenia żołądka i jelit. (Humoral and cellular responses in swine exposed to transmissible gastroenteritis virus). Am. J. vet. Res. 40, 108 — 110, 1979 (1).

Prosięta sześciotygodniowe zakażono doustnie lub donosowo zjadliwym szczepem wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (TGE, typ Miller 3) lub szczepem atenuowanym (Miller 60) w dawce 1×10^6 pfu. W okresie 7—56 dni po zakażeniu miano swoistych przeciwciał dla wirusa TGE w surowicy prosiąt zakażonych szczepem atenuowanym przewyższało miano przeciwciał u prosiąt zakażonych szczepem zjadliwym. W każdym przypadku natężenie odporności komórkowej mierzonej w teście zahamowania migracji limfocytów było wyższe u prosiąt zakażonych zjadliwym szczepem wirusa TGE. Odporność humoralna osiągała maksymalne natężenie 21 dnia po zakażeniu. Miano przeciwciał w odczynie SN u prosiąt zakażonych szczepem zjadliwym wynosiło 144, szczepem atenuowanym 346. Natomiast maksymalne natężenie odporności komórkowej stwierdzano 28 dnia po zakażeniu.

G.

G.