

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

EDMUND PROST, RYSZARD SŁUŻEWSKI

Znaczenie *Cl. perfringens* w higienie środków spożywczych

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie

Kierownik: prof. dr E. PROST

Drobnoustroje rodzaju *Clostridium*, nazywane popularnie beztlenowcami, obejmują w systematyce mikrobiologicznej Bergey'a 93 gatunki. W większości są to bakterie saprofityczne. Ze względu jednak na swe własności wzrostu w warunkach beztlenowych oraz aktywność biochemiczną, są drobnoustrojami wyraźnie niepożądanymi w produktach żywnościowych, a szczególnie w konserwach.

Odnosi się to tym bardziej do chorobotwórczych gatunków rodzaju *Clostridium*. Obok *Cl. botulinum*, najpoważniejszym przedstawicielem tej grupy jest *Cl. perfringens*. Drobnoustrój ten, o dość zróżnicowanym działaniu chorobotwórczym, tak dla zwierząt jak i człowieka, stał się w ostatnich latach przedmiotem szczególnego zainteresowania higieny żywności ze względu na coraz to częściej notowane przypadki zatruc pokarmowych u ludzi. Do niedawna notowane tylko sporadycznie, ostatnio zajmują trzecie miejsce po salmonellach i gronkowcach (64).

W ostatnich latach wielu autorów, zarówno krajowych jak i zagranicznych, opisuje mianowicie liczne i niekiedy masowe schorzenia pokarmowe wywołane przez *Cl. perfringens*. Szereg tego rodzaju przypadków podanych zostało w polskim piśmiennictwie (17, 18, 41, 42). W większości dochodziło do nich po spożyciu potraw mięsnych. Wg danych statystycznych (9) z lat 1952—62 *Cl. perfringens* był w Polsce przyczyną 0,6—4,7% zarejestrowanych ognisk zatruc pokarmowych; stanowiło to 16 epidemii zatruc na tle tego drobnoustroju, przy zachorowaniu 813 osób. Źródłem tych schorzeń było w 12 ogniskach (648 osób) mięso i przetwory mięsne a w 4 ogniskach (165 osób) inne produkty spożywcze.

Masowe zatrucia pokarmowe na tle *Cl. perfringens* notowane były również w innych krajach, a mianowicie Danii (81), Finlandii (13, 38), gdzie w latach 1957—61 zatrucia pokarmowe *Cl. perfringens* stanowiły 45% wszystkich zarejestrowanych, Japonii (32), Jugosławii (19), NRF (3), Szwecji (55), Węgrzech (54), Wielkiej Brytanii (20, 21, 30, 31, 57, 82, 83), gdzie wg Hobbs (57) *Cl. perfringens* był w 1965 r. przyczyną 25% oficjalnie stwierdzonych zatruc pokarmowych, USA (36, 53, 80) i ZSRR (33, 60, 69).

Udział *Cl. perfringens* w etiologii zatruc pokarmowych wiąże się zapewne w dużym stopniu z ubikwitalnością występowania tego drobnoustroju w przyrodzie.

Wyraźną częstą obecność *Cl. perfringens* wykazano w glebie. W Polsce stwierdzał Meisel (47) wy-

mieniony drobnoustrój niekiedy w 100% badanych próbek ziemi. Podobne badania przeprowadzone w innych krajach m.in. Australii (76), Cejlonie (85), Japonii (62, 86), USA (71) i ZSRR (65, 66) wykazały również wysoki stopień zakażenia. Według Sidorenki (66) stwierdzanie obecności *Cl. perfringens* w ziemi zależy w dużym stopniu od okresu badania, rejonu pobrania prób, jak również gatunku gleby. W miejscach przebywania człowieka lub zwierząt ilość wyizolowanych szczepów jest wyraźnie wyższa.

Cl. perfringens stwierdzić można prawie zawsze w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt.

W Polsce Meisel i wsp. (46) wyosabniali *Cl. perfringens* z kału ludzi zdrowych i chorych w 93,3% badanych próbek. Również i w innych krajach Czechosłowacji (35), Japonii (48, 49), USA (26, 27), Wielkiej Brytanii (16, 28), Włoszech (4), ZSRR (68) stwierdzano *Cl. perfringens* bardzo często w kale ludzi, otrzymując w niektórych przypadkach 95% pozytywnych wyników.

Podobnie jak u ludzi także i z przewodu pokarmowego zwierząt izolowano często *Cl. perfringens*, co wykazali w swoich badaniach: Cygan, Wawrzekiewicz (11, 84) i Brill (5) w Polsce, Shinjo i wsp. (61) oraz Oka (56) w Japonii, Sornicel (73) we Francji i Hobbs i wsp. (28) w Wielkiej Brytanii.

Notowane przypadki zatruc pokarmowych oraz powszechne występowanie *Cl. perfringens* w środowisku zewnętrznym (ziemia, kał) skłoniły wielu autorów do przeprowadzenia badań nad występowaniem tych bakterii w środkach spożywczych, szczególnie zwierzęcego pochodzenia. W badaniach bakteriologicznych powierzchni tusz wieprzowych (39, 52, 70), wołowych (51) i baranich (40) wykazano obecność *Cl. perfringens* w 6,7—61,4%.

Drobnoustrój ten stwierdzano także w znajdującym się w obrocie handlowym mięsie surowym; według Piwowarowa (58) najbardziej zakażoną okazała się baranina w 52,2%, następnie wołowina w 50,5% i konina w 31,9%. Hall i Angelotii (25) podają o częstym izolowaniu *Cl. perfringens* z cielęciny w 82%, wołowiny w 70%, baraniny w 52% i wieprzowiny w 37%. W Wielkiej Brytanii (45) w badaniach kontrolnych produktów spożywczych dostarczanych do szpitali wykazano *Cl. perfringens* w mięsie siekanym w 60%, a w mięsie drobiu w 100%. Podobne oznaczenia przeprowadzili także inni autorzy zarówno w kraju jaki i za granicą (14, 29, 59, 75, 77)

Szczególnie często izolowano *Cl. perfringens* z tkanki mięśniowej zwierząt poddanych ubo-

jowi z konieczności (50, 63, 67, 78). Przypuszczalnie, na skutek obniżenia oporności organizmu, przedostaje się *Cl. perfringens*, jak i inne drobnoustroje, z przewodu pokarmowego do krwiobiegu.

Dane piśmiennictwa podają również o stwierdzeniu *Cl. perfringens* w narządach zwierząt rzeźnych, a szczególnie w wątrobie (2, 8, 12, 87). Wątroby badane bezpośrednio po uboju wykazywały zakażenie *Cl. perfringens* w 12%, a pochodzące ze sprzedaży detalicznej nawet w 26% (8).

Wyniki badań nad częstością występowania *Cl. perfringens* w wędlinach i wyrobach wędliniarskich (6, 7, 10, 22, 44, 79, 89) wykazały dużą rozbieżność w zależności od rodzaju produktu jak również okresu pobierania prób.

Przeprowadzono również badania nad występowaniem *Cl. perfringens* w konserwach mięsnych.

Oznaczenia nad kształtowaniem się zakażenia w poszczególnych cyklach produkcyjnych konserw mięsnych przeprowadził Służewski (70). Badania te potwierdziły, że surowiec mięsny jest już wyjściowo w poważnym procencie zakażony drobnoustrojami rodzaju *Clostridium* w tym także we względnie wysokim stopniu *Cl. perfringens*. O ile w toku produkcyjnym konserw pasteryzowanych zakażenie *Cl. perfringens* wykazuje tendencje spadkową, to przy konserwach sterylizowanych dochodzi w poszczególnych fazach produkcji do poważnego narastania częstości zakażenia. Istotnym jest jednak, że proces wyjąłowania, a szczególnie konserw sterylizowanych, nie jest w stanie całkowicie zlikwidować zakażenia *Cl. perfringens*. W gotowych produktach drobnoustroje te mogą występować w konserwach sterylizowanych od 1,1% (70) do 16,9% (23), a w konserwach pasteryzowanych od 3,3—4,4% (70) do 24,36% (23).

W kształtowaniu się zakażenia produktów mięsnych odgrywa pewną rolę również środowisko produkcyjne. W badaniach Służewskiego (70) wykazano mianowicie występowanie *Cl. perfringens* na maszynach i urządzeniach

przetwórci mięsnych oraz na rękach personelu produkcyjnego. Dodatkowym źródłem zakażenia są również dodawane do wyrobów mięsnych przyprawy. Niektóre z nich jak np. pieprz wykazują zakażenie *Cl. perfringens* od 10% (70) do nawet 100% (72).

Z przedstawionych danych wynika, że *Cl. perfringens* jest drobnoustrojem występującym nadspodziewanie często w środkach spożywczych, szczególnie zwierzęcego pochodzenia. Interesującym stąd zagadnieniem jest sprawa chorobotwórczości tego drobnoustroju, a szczególnie rola w powstawaniu tzw. zatruc pokarmowych.

Cl. perfringens w klasyfikacji mikrobiologicznej nie jest gatunkiem jednolitym i w jego obrębie zróżnicowano szereg typów oraz podtypów. Podział systematyczny opiera się na wytwarzanych przez ten drobnoustroj toksynach o własnościach antygenowych, których dotychczas określono dwanaście. Cztery z nich, zwane antygenami większymi (major antigens), głównie związane z działaniem chorobotwórczym, stały się podstawą podziału na pięć typów A, B, C, D i E. Pozostałe osiem tzw. antygeny mniejsze (minor antigens), o niewielkim działaniu toksycznym i roli w patogenności drobnoustroju, pozwoliły na określenie podtypów, których ilość nie jest przypuszczalnie jeszcze zamknięta.

Klasyfikację *Cl. perfringens*, z charakterystyką antygenową toksyn, wg Sterne'a i Warrack'a (74) podano w tabeli 1.

W etiologii zatruc pokarmowych u ludzi, pochodzenia żywnościowego, odgrywają rolę jedynie typ A, podtyp 2 i typ C, podtyp 4 i 5. Określenie szczepów *Cl. perfringens* należących do wymienionych typów i podtypów nie jest jednak sprawą technicznie łatwą i nadającą się dla bieżącej diagnostyki. Stąd też czy-

Tab. 1. Klasyfikacja *Cl. perfringens* wg Sterne & Warrack (1964)

| Typ | Podtyp | Patogenność | Antygeny większe (Major antigens) | | | | | | Antygeny mniejsze (Minor antigens) | | | | | | |
|-----|--------|--|--------------------------------------|------|---------|------|-------|-------|---------------------------------------|-------|------------|------------|---------------|---------------------|-----|
| | | | α | β | ε | ι | γ | δ | η | θ | κ | λ | μ | ν | |
| | | | alfa | beta | epsilon | iota | gamma | delta | eta | theta | kappa | lambda | mu | nu | |
| | | | L, n | L, n | L, n | L, n | L | L, h | L | h, t | kolagenaza | proteinaza | hialuronidaza | dezyksyrybonukleaza | |
| A | 1 | Zgorzeł gazowa u ludzi i zwierząt | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ | + | + | 0 | + | + |
| | 2 | Zatrucia pokarmowe u ludzi | +++ | 0 | 0 | 0 | - | 0 | - | + | + | + | 0 | + | +++ |
| B | 1 | Dysenteria jagniąt. Enterotoksemia zrebriąt | +++ | +++ | +++ | 0 | ++ | 0 | - | ++ | 0 | +++ | +++ | +++ | + |
| | 2 | Enterotoksemia owiec i kóz | +++ | +++ | +++ | 0 | - | - | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | + | + |
| C | 1 | Enterotoksemia owiec | +++ | +++ | 0 | 0 | ++ | +++ | - | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | + |
| | 2 | Enterotoksemia cieląt i jagniąt | +++ | +++ | 0 | 0 | - | 0 | - | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | + |
| | 3 | Enterotoksemia prosiąt | +++ | +++ | 0 | 0 | - | 0 | - | +++ | +++ | 0 | + | + | +++ |
| | 4 | Zmarliwające zapalenie jelit u ludzi (szczep niemiecki), dawny typ F | +++ | +++ | 0 | 0 | +++ | 0 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| | 5 | Zmarliwające zapalenie jelit u ludzi (szczep Papua - New Guinea) | +++ | +++ | 0 | 0 | - | 0 | - | + | + | 0 | + | + | - |
| D | | Enterotoksemia owiec, jagniąt, kóz bydła (ewentualnie ludzi) | +++ | 0 | +++ | 0 | - | 0 | - | +++ | + | + | + | + | + |
| E | | Wątpliwa chorobotwórczość dla owiec i bydła | +++ | 0 | 0 | +++ | - | 0 | - | +++ | +++ | +++ | + | + | + |

l = działanie letalne; n = działanie nekrotyzujące; h = działanie hemolizujące; t = wrażliwy na tlen
 +++ = wytwarza większość szczepów; ++ = wytwarzają niektóre szczepy; + = wytwarzają nieliczne szczepy,
 0 = nie wytwarza żaden szczep; - = nie badano.

nione są próby w kierunku szybkiego rozpoznawania podejrzanych o wywołanie zatrucia szczepów. Stwierdzono, że drobnoustroje te cechują się, w przeciwieństwie do pozostałych typów i podtypów, wyraźną termoopornością, przeżywania w temp. 100°C przez okres 1—5 godzin (28). Własność ta ma być charakterystyczna dla typu A, podtyp 2 oraz typu C, podtyp 4, przy czym nie jest zawsze regułą. Cech termooporności nie wykazuje natomiast podtyp 5, typu C, który zresztą w Europie nie został dotąd wyizolowany z przypadków zatrucia pokarmowych u ludzi.

Hobbs i wsp. (28, 31) uzyskali z licznymi szczepów *Cl. perfringens* typu A, podtyp 2, wyosobnionych z przypadków epidemii pokarmowych u ludzi w Anglii, 13 surowic aglutynacyjnych, pozwalających na szybkie rozpoznawanie podejrzanych o wywołanie schorzenia drobnoustrojów. Metodą tą można określić około 70% szczepów *Cl. perfringens* typ A będących czynnikiem etiologicznym zatrucia pokarmowych. Szczepy powyższe charakteryzować się mają ponadto dodatnią reakcją Naglera oraz brakiem hemolizy beta na agarze z krwią końską.

Reasumując, należy stwierdzić, że sprawa szybkiego i pewnego rozpoznania szczepów *Cl. perfringens* będących czynnikiem etiologicznym zatrucia pokarmowych, nie jest właściwie dotąd rozwiązana. Ma to o tyle szczególne znaczenie, że *Cl. perfringens* występuje dość powszechnie w przyrodzie a stosunkowo często w środkach spożywczych zwierzęcego pochodzenia i określenie szczepów potencjalnie chorobotwórczych napotyka tym samym na poważne trudności.

Dotychczasowe obserwacje szeregu autorów wskazują, że zatrucia pokarmowe występują prawie wyłącznie po spożyciu określonych produktów, przeważnie mięsnych, w których doszło do poważnego wzrostu ilościowego *Cl. perfringens*. Pozostaje to oczywiście w związku z warunkami środowiskowymi, umożliwiającymi namnożenie tych bakterii.

Optymalną temperaturą wzrostu *Cl. perfringens* jest 43—47°C, przy minimum w ca 15°C i maksimum w ca 50°C. Drobnoustrój przetrzymuje temperaturę mroźni, jak stwierdzono to doświadczalnie —5°C i —20°C (1).

Wzrost bakterii zależny jest również od pH, potencjału oksydoredukcyjnego oraz obecności soli peklujących w produkcie. Optymalnym pH dla rozmnażania i kiełkowania zarodników jest 7,2 (31); wzrost ulega zahamowaniu wraz z obniżeniem pH przy czym u 20—30% szczepów stwierdzono go jeszcze przy pH = 4,3 (70). Niski potencjał oksydo-redukcyjny sprzyja wyraźnie wzrostowi, którego intensywność zmniejsza się przy obniżeniu potencjału a ulega całkowitemu zahamowaniu przy +250 mV (34).

Cl. perfringens wykazuje również wrażli-

wość na obecność soli peklujących (24, 31, 37, 43, 46, 70), przy czym wyraźnym inhibitorem mają być azotyny. W solankach drobnoustrój może przeżywać jedynie krótki okres czasu i stosunkowo szybko ginie.

Najbardziej istotnym czynnikiem w etiologii zatrucia pokarmowych jest jednak termooporność. W porównaniu do innych gatunków rodzaju *Clostridium* zarodniki *Cl. perfringens* nie wykazują szczególnej oporności na działanie wysokiej temperatury. Tylko niektóre szczepy są zdolne do przeżycia termicznych procesów kulinarnych. Stąd też, mimo częstego występowania tego drobnoustroju w surowcach spożywczych, zatrucia pokarmowe na tle *Cl. perfringens* nie zdarzają się wcale tak często. Jest szczególnie interesującym, że zatrucia pokarmowe na tle *Cl. perfringens* mają miejsce prawie wyłącznie po spożyciu potraw głównie mięsnych, które po kulinarnych zabiegach termicznych przetrzymywane były przez pewien czas w warunkach niechłodzonych lub też podgrzewanych w niezbyt wysokiej ciepłocie. Były to najczęściej pieczenie, pasztety, rolady oraz mięsa siekane i mielone, przyrządzone w większych blokach o wadze około 3 kg. Należy sądzić, że surowiec był już wyjściowo zakażony *Cl. perfringens*. Proces termiczny powodował odtlenienie produktu z wytworzeniem warunków beztlenowych i obniżeniem tym samym potencjału oksydoredukcyjnego. Zabicie towarzyszącej mikroflory wegetatywnej, która mogła ewentualnie działać hamująco, stwarzało warunki do wzrostu termoopornych zarodników *Cl. perfringens*. Równocześnie tzw. szok termiczny ma być czynnikiem wyraźnie stymulującym kiełkowanie zarodników i następnie szybkie namnożenie bakterii. Odgrywa w tym istotną rolę także temperatura, która wewnątrz produktu w czasie jego powolnego ostygnięcia oscyluje w granicach optymalnych dla *Cl. perfringens*. Stwierdzono, że w tych warunkach już po 1,5 godzinie dochodzi do takiego namnożenia ilościowego *Cl. perfringens*, które wywołać może zatrucie pokarmowe. Z podanych względów mają one miejsce głównie w zakładach zbiorowego żywienia (stołówki, kantyny, restauracje) a stosunkowo rzadko w gospodarstwach domowych przygotowujących posiłki w niewielkich ilościach i zwykle natychmiast po ugotowaniu spożywanych.

Mimo istotnego stwierdzenia, że dla wywołania zatrucia pokarmowego na tle *Cl. perfringens* nieodzowna jest duża ilość bakterii, określona dla jednego osobnika na kilkaset milionów (34), nie zostało dotąd wyjaśnione jaki jest właściwie mechanizm samego schorzenia. Powszechnym jest pogląd, że bezpośrednim czynnikiem przyczynowym jest któraś z toksyn wytwarzanych przez *Cl. perfringens* w żywności jeszcze przed jej spożyciem. Równocześnie jednak w szeregu doświadcz-

niach, tak na ludziach-ochotnikach jak i na zwierzętach doświadczalnych, którym podawano *per os* kultury bakteryjne lub też filtry *Cl. perfringens*, wyosobnionych z przypadków zatruc, nie zdołano wywołać typowych objawów chorobowych. Do zatruc pokarmowych dochodziło jedynie wówczas kiedy ochotnicy spożywali potrawy mięsne w których miał miejsce aktywny wzrost *Cl. perfringens*.

W tej chwili jedyną do przyjęcia interpretacją mechanizmu zatruc podał Nygren (55). Według niej obecna w żywności lecytyna ulega hydrolizie pod wpływem fosfolipazy C (lecytynazy) z wytworzeniem jako produktu fosforylcholino. Substancja ta jest w stanie, jak to potwierdzono w doświadczeniach na zwierzętach laboratoryjnych, wywołać w 8—12 godzin po podaniu *per os* biegunki oraz zespół charakterystycznych objawów chorobowych. Produkowana przez *Cl. perfringens* toksyna alfa jest chemicznie lecytynazą (fosfolipazą C), którą wytwarza m. in. także i *Bac. cereus*.

Kliniczne objawy zatrucia pokarmowego na tle *Cl. perfringens* występują z reguły po 8—24 godz. i charakteryzują się zwykle biegunką, bólami brzucha i nudnościami. Stwierdzono pewne różnice w obrazie klinicznym w zależności od typu drobnoustroju. Zatrucia wywołane przez typ A, podtyp 2 przebiegają na ogół łagodniej, bez wymiotów, podwyższonej temperatury i bólów głowy, wygasają po 24 godz., a zejścia śmiertelne są bardzo rzadko notowane i dotyczą jedynie osób starych lub wyniszczonych. Obserwacja (15) epidemii zatrucia wywołanego przez wymieniony typ u 110 studentów wykazały następujące objawy kliniczne: biegunka — 90 osób, bóle brzucha

— 83, bóle głowy — 44, nudności — 36, gorączka — 9, kał z domieszką krwi — 8, wymioty — 7.

Zatrucia pokarmowe wywołane przez typ C, podtyp 4 charakteryzują się o wiele bardziej ostrymi objawami. Schorzenie rozpoczyna się gwałtownymi bólami brzucha i wymiotami a następnie dochodzi do silnej biegunki z podwyższeniem temperatury. Zejścia śmiertelne są dużo częstsze i wg Zeisslera i Rassfeld-Sternberga (88) kształtują się nawet w granicach 33% przypadków.

Stosunkowo długi okres inkubacji zatrucia na tle *Cl. perfringens* sugeruje działanie czynnika chorobowego na jelita grube, w których stwierdza się przede wszystkim zmiany chorobowe.

Przedstawione dane na temat mechanizmu oraz przebiegu zatruc pokarmowych wywołanych przez *Cl. perfringens* zawierają jeszcze szereg niejasności. Pozwalają one jednak na stwierdzenie, że dla wystąpienia schorzenia istotną rolę odgrywa nie sama tylko obecność *Cl. perfringens* w środku spożywczym ale jego poważne namnożenie ilościowe. Istotnym jest również, że tego rodzaju wzrost ilościowy *Cl. perfringens* możliwy jest jedynie w następstwie zabiegów termicznych. W surowych produktach, przypuszczalnie ze względu na antagonizm mikroflory towarzyszącej, nie dochodzi nigdy do tak poważnego wzrostu ilościowego, mimo częstego występowania *Cl. perfringens* w żywności.

Piśmiennictwo, obejmujące 89 pozycji, znajduje się u autorów.

Adres autorów: Lublin, ul. Akademicka 11.

CELESTYN SZCZUCKI

Łódź

Nowa „bibułowa” metoda mikrobiologicznych badań ilościowych mięsa i przetworów mięsnych

Podstawą kwalifikowania jakości mikrobiologicznej mięsa i przetworów są wyniki badań zarówno jakościowych jak i ilościowych. Szczególnie te ostatnie winny odgrywać w ocenie zasadniczą rolę, bowiem poza bardzo nielicznymi przypadkami występowania mikroflory chorobotwórczej, we wszystkich pozostałych podstawą wnioskowania i decyzji może być nie sam fakt obecności mikroflory saprofitycznej czy nawet warunkowo-chorobotwórczej, a stopień zakażenia produktu tą mikroflorą.

Ogólny stan sanitarny, świeżość, potencjalne zagrożenie trwałości czy nawet zdrowotności jest funkcją sumy przemian metabolicznych, których praktycznym wyrazem jest liczebność mikroflory. W takiej sytuacji zakres i często-

ściwość a więc operatywność kontroli rutynowej prowadzonej przez laboratoria WIS, przemysłowe czy służby San.-Epid. zależy od prostoty i przystępności obowiązującej metodyki, a podstawność lub rzeczowość interpretacji — od dokładności i precyzji stosowanych metod.

W tym zakresie obserwuje się od szeregu lat stagnację jeśli nie wyraźny impas koncepcyjny. Wyrazem tego jest np. obowiązująca metodyka *), która obok pracochłonnej homogenizacji mechanicznej materiału i posiewu płytkowego z licznych rozcieńczeń, dopuszcza jako „orientacyjną” metodę posiewu odciskowego. Jest ona wprawdzie kapitalnie prosta,

* (PN — 66/A — 82054 — Mięso i przetwory mięsne. Badania bakteriologiczne).