

# MEDYCYNĄ WETERYNARYJNĄ

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ  
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

## REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,  
prof. dr Abdon STRYSZAK, prof. dr Stanisław WOŁOSZYN

Sekretarz naukowy: dr Elżbieta PEŁCZYŃSKA

## RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, doc. dr Stefan JAKUBOWSKI, prof. dr Lech JĄSKOWSKI, prof. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, doc. dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Edward PINKIEWICZ, prof. dr Zbigniew SAMBORSKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Eustachy SZELIGOWSKI, doc. dr Krzysztof SWIEŻYŃSKI, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

## HIGIENA ŻYWNOCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

ZYGMUNT CYGAN, EDMUND PROST

### Zatrucia pokarmowe człowieka wywołane przez *Cl. perfringens*

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie  
Z Instytutu Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

#### Historia

Schorzenie człowieka, o przebiegu przypominającym zatrucie pokarmowe (ZP) na tle *Cl. perfringens*, zostało po raz pierwszy opisane w 1895 r. przez Kleina (27) w Anglii. Nie jest jednak jasne, czy wyosobnioną wówczas laseczkę tzw. *Bac. enteritidis sporogenes* można uznać za *Cl. perfringens*. Podobne wątpliwości etiologiczne nasunęły kolejne, mało dokładne raporty Andrewsa (3), Kendalla i Smitha (26), a ponadto Larnera (28) oraz Nelsona (44). Dopiero w 1945 r. McClung (31) podał pierwszy, dobrze udokumentowany opis zatrucia pokarmowego na tle *Cl. perfringens*. W badaniach tych, podobnie jak i w nieco późniejszych pracach Osterlinga (48) w Szwecji oraz Hobbs i wsp. (24) w Anglii, wskazano na działanie chorobotwórcze ciepłoopornych szczepów *Cl. perfringens* A. W 1959 r. McKillop (33) zasugerowała udział w etiopatogenezie ZP również i ciepłowrażliwych szczepów tego gatunku. Powyższą sugestię poparłi później w swoich badaniach Hall i wsp. (18), Taylor i Coetzee (61) oraz Sutton i Hobbs (60). Dopiero jednak w 1967 r. Hau-

schild i Thatcher (22), przeprowadzając na ochotnikach udane próby reprodukcji ZP, dowiedli roli przyczynowej tych ciepłowrażliwych beztlenowców.

Zachorowania te miały z reguły charakter „*enteritis acuta*”, zwykle bez gorączki, przy ustępujących w ciągu 24 godzin objawach biegunki, bólów brzucha i nudności, a niekiedy również wymiotów.

Całkowicie natomiast odmienny charakter posiadały masowe zatrucia, jakie wystąpiły w Niemczech w latach 1946—48. Zeissler (70) oraz Zeissler i Rassfeld-Sternberg (71), a także Oakley (47) dowiedli, że były one wywołane przez ciepłooporne szczepy *Cl. perfringens* C i przebiegały w formie „*enteritis necroticans*”. W późniejszym czasie zostały stwierdzone dalsze, chociaż sporadyczne, zachorowania w USA, Anglii, Francji i Ugandzie (54, 62). Zasługuje na uwagę, że w 1963 r. Murrell i Roth (38) oraz Egerton i Walker (15) w przypadkach tego schorzenia w Nowej Gwinei, wykazali ciepłowrażliwe laseczki *Cl. perfringens* C, o pewnej analogii do szczepów enterotoksemii zwierząt.

Zatrucia pokarmowe pozostawały najczęściej w związku ze spożywaniem potraw mięsnych. Niekiedy tylko, przyczyną ich były produkty roślinne oraz ryby. W 1962 r. Abrahams (1) opisał zatrucie tubylców, podczas ich tradycyjnego święta „Homowo” w Akrze (Ghana), spowodowane spożyciem potrawy pn. „Kpokoi” złożonego z kukurydzy, oliwek i ryby. W podobnym przypadku przedstawionym w 3 lata później w Japonii przez Sugitani i Takamatsu (58), intoksykację wywołała potrawa rybna „kamaboko”.

### Etologia

Zatrucia pokarmowe (ZP) na tle *Cl. perfringens* wywołują najczęściej szczepy serotypu A (18, 23, 24), ale niekiedy również i serotypu C (15, 38, 47, 70, 71). Czynnikiem chorobotwórczego działania tych obu beztlenowców jest jednak całkowicie różny. Przy zatruciach wywołanych przez serotyp A główną rolę patogenetyczną spełnia enterotoksyna (12, 13, 14, 20, 21), natomiast w przypadku serotypu C toksyna beta (15, 47, 70).

Przez szereg lat wiązano ZP o charakterze „*enteritis acuta*” ze szczepami, które na podłożach agarowych z krwią owczą tworzyły hemolizę alfa (24). Później okazało się, że podobne znaczenie posiadają także silnie hemolityczne szczepy, produkujące enterotoksynę (6, 40).

Niektórzy autorzy (29, 34) wysunęli sugestię, że przyczyną toksoinfekcji pokarmowych u człowieka mogą być także laseczki *Cl. perfringens* D. Pogląd ten, przez wiele lat mało popularny, niedawno zyskał poparcie w wynikach badań Uemury i Skjelkvale (67), wskazujących na aktywność enterotoksynogenną tych beztlenowców.

### Rezerwuary zarazka

Betzlenowce *Cl. perfringens* są szeroko rozpowszechnione w 2 biosiedliskach tj. w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt (24, 32, 50) oraz w ziemi (34). Bakterie te mogą przedostawać się już przyżyciowo z przewodu pokarmowego do różnych narządów organizmu. Proces ten, określany przez Genigeorgisa (16) jako infekcja endogenna, jest tylko zwykłym, bakteryjnym zanieczyszczeniem tkanek (wobec braku objawów zakażenia). Ostatecznie więc przy rozważaniu występowania beztlenowców w produktach żywnościowych (zwierzęcych), można wyróżnić 2 źródła tych zanieczyszczeń tj. z jelit (endogenne) i z ziemi (egzogenne).

W kontekście tych spraw odżywa znowu dawne zagadnienie, czy pierwotny rezerwuuar tych bakterii stanowi przewód pokarmowy, czy też ziemia. Obecnie przeważa pogląd uznający dominującą rolę flory jelitowej we wtórnym zanieczyszczeniu ziemi. Przemawiają za tym badania nie wykazujące na ogół laseczek *Cl. perfringens* w próbkach nienawożonej ziemi, np. pochodzącej z pustyń (34, 35).

Przeprowadzone badania nad ilościową zawartością zarazka w kale ludzkim dały dość rozbieżne wyniki. Średnie bowiem ilości spor u badanych osób wynosiły w Anglii  $10^3/g$  (25) i Australii  $10^4/g$  (59), podczas gdy w Kanadzie  $2,5 \times 10^3 - 6,3 \times 10^6/g$  (4) oraz w Japonii  $10^5/g$  (2). Niewykluczone, że powyższe odchylenia są w pewnym stopniu rezultatem odrębności systemów odżywiania się ludzi w tych krajach.

Przebadano również rozpowszechnienie *Cl. perfringens* w kale zwierzęcym (63). Beztlenowce te stwierdzono w 88% u kurcząt, w 80% u bydła i w 89% u bydła podgatunku „zebu”. U kurcząt ilość bakterii dochodziła do  $10^1/g$ , u bydła  $3,2 \times 10^2/g$ , a u „zebu” wahała się od  $10^3$  do  $1,5 \times 10^6/g$ . W badaniach Bryana (6) liczba stwierdzanych laseczek w kale bydła, owiec, świń i kurcząt wynosiła od  $10^2$  do  $10^4/g$ . U psów i kotów osiągała natomiast koncentrację  $10^8 - 10^9/g$  (16).

Możliwość przechodzenia laseczek *Cl. perfringens* z jelit do systemu żyły wrotnej i ogólnego krwioobiegu jest już dowiedzonym faktem. Odnośne beztlenowce najczęściej wykazywano w wątrobie zdrowych zwierząt (8, 49) oraz człowieka (55, 68). Rzadziej występowały one w mięśniach, węzłach chłonnych krezki, w nerkach i śledzionie zdrowych krów, owiec, a także świń (9, 10, 41, 42, 43). Podkreślić przy tym należy, że rozpowszechnienie beztlenowców, w aseptycznie pobranych próbkach z węzłów chłonnych krezki i mięśni filarów przepony, było niższe niż 3%, przy koncentracji tych zarazków  $< 10^1/g$  tkanek, co wskazuje na względnie niską ekstensywność i intensywność odnośnych, bakteryjnych zanieczyszczeń (36).

Intensywność endogennych zanieczyszczeń tkanek wzrasta u zwierząt nie głodzonych oraz nie wypoczętych przez 12—24 godzin przed ubojem (10, 43). Wskaźnik ilości zarazka w jelitach, a tym samym i w tkankach, zależy także od warunków transportu zwierząt (5). Osiągał on wyższe wartości przy przewozie kolejowym niż samochodowym ( $P < 0,05$ ), a także wzrastał w suche dni, a spadał w okresie deszczów ( $P < 0,01$ ).

Dane co do rozpowszechnienia enterotoksynogennych szczepów *Cl. perfringens* A są dość skąpe. Początkowe obserwacje Yasukawy i wsp. (69) wskazywały na ich sporadyczną obecność w treści jelitowej człowieka. Ostatnio jednak Uemura (64), stosując specjalną metodykę, wykazał, że aż 35% tych szczepów wytwarzało enterotoksynę w koncentracji powyżej  $0,1 \mu g/ml$  hodowli. W przypadku bydła wskaźnik występowania enterotoksynogennych laseczek był jeszcze wyższy i wynosił 68% (63).

Szczepy enterotoksynogenne indukują powstawanie w organizmie swoistych, lecz bez właściwości ochronnych, przeciwciał. Antyenterotoksyny stwierdzono u 85% mieszkańców Brazylii i 65% z USA (65). Co więcej, poziom tych przeciwciał był na ogół stabilny, co zdanem Uemury i wsp. (65) sugeruje ciągle pro-

dukowanie enterotoksyny w przewodzie pokarmowym człowieka. Podkreślić przy tym należy pewną korelację pomiędzy stężeniem przeciwciał we krwi, a liczbą komórek *Cl. perfringens* w kale. Ilość beztlenowców, przy mianie antyenterotoksyn  $> 100$ , przekraczała zwykle koncentrację  $10^3/g$  kału (5).

Rezerwuary laseczek *Cl. perfringens* C nie są jeszcze bliżej poznane. Zawsze jednak w przypadkach „*enteritis necroticans*” stwierdzano niehigieniczne warunki przechowywania surowego mięsa i jego przetwarzania. Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie serotypu C wydaje się, że zwierzęta stanowią główne ich źródło (37).

### Patogeneza i przebieg zatruc pokarmowych

Schorzenie występuje zwykle po spożyciu potraw mięsnych, mlecznych lub jarzyn, podanych poprzedniego dnia zabiegowi termicznemu (gotowanie, pieczenie) i nie od razu schłodzonych. W utlenionym na skutek procesu termicznego i powoli stygnięciem środkiem spożywczym stworzone zostają korzystne warunki do rozwoju i sporulacji tych bakterii, które przetrzymały działanie wyższej temperatury. Związany z przygotowaniem żywności „szok termiczny” jest czynnikiem pobudzającym kiełkowanie i sporulację (24, 31, 64). W rozwijającej się hodowli może dochodzić do wytworzenia, jako etiopatogenetycznych czynników, enterotoksyny (zatrucia głównie na tle *Cl. perfringens* A) oraz toksyny beta (intoksykacje wywołane przez *Cl. perfringens* C). Ostatecznie jednak o wystąpieniu schorzenia decyduje wtórne namnożenie się zarazka w jelitach cienkich z wytworzeniem „*in situ*” tych toksyn.

Przebieg kliniczny oraz zejście procesu chorobowego zależą od serotypu bakterii. Według Hobbs i wsp. (24) oraz Halla i wsp. (18) laseczki *Cl. perfringens* A powodują ostre, z reguły ustępujące w ciągu 8—24 godzin objawy zatrucia, zwykle z biegunką, ale najczęściej bez wymiotów („*enteritis acuta*”). Zejścia śmiertelne zdarzają się rzadko i dotyczą jedynie osobników starszych i wyniszczonych.

Daleko ciężiej przebiegają, związane z *Cl. perfringens* C, zatrucia pokarmowe w formie „*enteritis necroticans*”. W RFN, jak podali Zeissler i Rassfeld-Sternberg (71), na ogólną ilość 1056 przypadków nekrotycznego zapalenia jelit (tzw. „*darmbrand*”), zanotowanych od 1946 do 1948 r., przebieg śmiertelny stwierdzono w 33,3%. Przy analogicznym co do etiologii schorzeniu na Nowej Gwinei (syndrom „*pig bel*”) śmiertelność, pomimo intensywnej terapii, wynosiła 35—40%. Jako główne objawy choroby stwierdzano ostre bóle brzucha, krwawą biegunkę i wymioty.

### Diagnostyka schorzenia

Podstawową zasadę w nowoczesnej diagnostyce zatruc pokarmowych na tle *Cl. perfrin-*

*gens* stanowi dążenie do wykazania enterotoksyny i enterotoksynogennych szczepów w kale chorych osób (52). Niskie koncentracje stwierdzanej enterotoksyny, wahające się zwykle od  $0,2 \mu g$  do  $16 \mu g/g$  kału (51, 52), określają skalę wymagań względem czułości metod identyfikacyjnych. Spośród metod biologicznych, odczyn letalny na myszach zapewnia wykrycie  $1,8—3 \mu g$  toksyny, podczas gdy śródskórny na świnkach morskich  $0,06—0,0125 \mu g$ , a w podwiązanych pętłach jelit królików zaledwie  $6,25 \mu g$  (17, 56, 57, 66). Przydatność tych technik ogranicza niewielka ich czułość oraz znaczne koszty użytych zwierząt (19). Natomiast odczyny serologiczne tj. hemaglutynacji pośredniej (HaP), elektroimmunodiffuzji (EID), a częściowo również żeldyfuzy (ŻD) posiadają znacznie wyższą czułość i swoistość. Najmniejsze koncentracje wykrywanej enterotoksyny wynosiły przy HaP  $0,00005 \mu g$  (17, 66), EID  $0,002 \mu g$  (17, 39), a ŻD  $0,3 \mu g$  (17, 56).

Na szczególną uwagę zasługuje odczyn immunofluorescencji (IF) użyty do stwierdzania wytwarzanej śródkomórkowo enterotoksyny tj. jeszcze w cytoplazmie laseczek *Cl. perfringens* (45, 46). Według Niilo (45, 46) posiada on najwyższą czułość i pozwala wykazać odnośny antygen już w 4 godzinie wzrostu zarazka. Wraz z wiekiem takiej hodowli maleje jednak koncentracja zawartej w laseczkach toksyny i w 10 godzinie ich wzrostu nie jest już wykrywalna.

### Epidemiologia

Zatrucia pokarmowe człowieka, wywołane przez *Cl. perfringens*, są najczęściej następstwem spożywania gotowanych potraw mięsnych, podrobów i sosów, a także lekko pieczonego mięsa (16). Cytowane przez Genigeorgisa (16) dane z „National Center for Disease Control” wskazują na związek schorzenia w 78,9% z mięsem i produktami mięsnymi (mięso wołowe 40,6% przypadków, indycze 24,6%, drobiowe 9% i wieprzowe 3,1%). Niekiedy, gdyż tylko w 5,5%, za wybuch schorzenia odpowiedzialne były owoce i jarzyny, w 3,5% ryby, a jedynie w 2,3% produkty mleczne. W większości zachorowania dotyczyły osób korzystających z publicznych jadłodajni (49% przypadków) oraz szkolnych stołówek (22%), a rzadziej z żywienia domowego (16%).

Według danych z USA, największe nasilenie zatruc notowano w okresie od kwietnia do maja (48% ognisk), mniejsze od czerwca do października (ogółem 32%) oraz od listopada do stycznia (21%). Względny spadek częstotliwości schorzenia w okresie letnim wiązano z przerwą wakacyjną, w której nie były czynne szkolne stołówki. Ponadto, pewien wpływ posiadała także niechęć ludzi do spożywania w lecie gotowanych potraw (30).

Bryan i wsp. (7) poddali ocenie udział poszczególnych czynników predysponujących do wybuchu zachorowań w 59 ogniskach ZP. Jako

podstawowy czynnik, we wszystkich przypadkach, wykazano nieodpowiednie temperatury przetrzymywania żywności. W 78% zachorowań stwierdzano brak zabezpieczenia właściwego schładzania pokarmów. Ważnym też czynnikiem było przygotowywanie posiłków na dzień lub więcej przed spożyciem. W 38% uznawano za przyczynę niedostateczne podgrzanie gotowanych pokarmów. Natomiast tylko 10% epidemii było następstwem zanieczyszczonych *Cl. perfringens* surowców.

Liczba beztlenowców *Cl. perfringens* zawartych w żywności, wywołującej objawy zatrucia, waha się w dość szerokich granicach tj. od  $2 \times 10^4$  do  $10^9/g$  produktu (11, 16). Smith (53), wobec fragmentaryczności tych danych, wyraża jednak pewne zastrzeżenie co do ostatecznej ilości komórek bakteryjnych, potrzebnych do spowodowania choroby. Zawsze bowiem należy jeszcze uwzględnić aktywność enterotoksynogenną szczepu, która jak wykazano, jest nawet w przypadku poszczególnych komórek bakteryjnych bardzo zróżnicowana (45, 46).

### Podstawy profilaktyki

Dążenie do uzyskania całkowicie sterylnego surowca, przy fizjologicznej predyspozycji organizmów zwierzęcych do przyżyciowego samozanieczyszczania swych tkanek mikroflorą jelitową w tym i beztlenowców *Cl. perfringens*, jest mało realne (16). Podkreślić przy tym należy, że ze względów praktycznych niewielka ilość tych bakterii (przy braku możliwości wtórnego namnożenia), nie stanowi jeszcze bezpośredniego zagrożenia tak dla zdrowia konsumenta, jak i trwałości produktu. Biorąc jednak pod uwagę, że liczba enterotoksynogennych laseczek w żywności jest podstawą ich potencjalnej szkodliwości, należy dążyć do przestrzegania szeroko pojętych zasad prewencji. Największe niebezpieczeństwo stwarzają niezupełnie sterylne produkty mięsne, zbyt wolno schładzane po ich zabiegu termicznym. Słusznie stąd postuluje się, żeby duże porcje gotowanego mięsa, rosoly, sosy itp. były doprowadzane w ciągu 2—3 godzin do temperatury  $< 10^\circ C$ . Natomiast przy przechowywaniu posiłków zalecane są temperatury  $< 5^\circ C$  lub  $> 60^\circ C$  (16).

Duże bloki mięsa, uprzednio zamrożone, powinny być całkowicie odmrożone przed gotowaniem. Jest to szczególnie ważne przy przyrządzaniu mięsa indyczego, w którym zbyt wolno jest osiągana właściwa temperatura wewnętrzna tj.  $> 74^\circ C$  (7).

Przechowywane, a uprzednio gotowane posiłki, bezwzględnie wymagają ponownego zagotowania przed spożyciem. Szereg bowiem enterotoksynogennych szczepów *Cl. perfringens* przetrzymuje proces ogrzewania w temperaturze  $< 100^\circ C$ .

Specjalną uwagę należy poświęcić potrzebie odrębności sprzętu i wyposażenia do przewozu surowców i gotowych produktów żywnościowych.

Jest to jedna z ważniejszych, lecz mniej docenianych, ogólnych zasad profilaktycznych.

Redukcję liczby *Cl. perfringens* w różnych surowcach, głównie mięsnych, można uzyskać poprzez konsekwentne przestrzeganie zasad sanitarnych przy transporcie i przygotowywaniu zwierząt do uboju oraz rozbiórce tusz mięsnych. Człowiek, jako powszechny nosiciel i siewca *Cl. perfringens*, powinien być również obiektem dużej uwagi, tym bardziej, że wyeliminowanie tego źródła zanieczyszczenia produktów żywnościowych wcale nie jest łatwe.

Reasumując należy stwierdzić, że ograniczenie tych ciągle aktualnych zatruc pokarmowych wymaga wzrostu określonej świadomości konsumentów oraz przestrzegania higieny technologicznej, a także osobistej pracowników, zatrudnionych przy wytwarzaniu żywności.

### Piśmiennictwo

1. Abrahams C.: West Afr. med. J. 11, 113, 1962.
2. Akama K., Otani S.: Jap. J. med. Sci. Biol. 23, 161, 1970.
3. Andrews F. W.: cyt. wg poz. 54.
4. Barnes E. M., Despain J. E., Ingram M.: J. appl. Bact. 26, 415, 1963.
5. Brant P. C.: Study of Enterotoxigenic Clostridium perfringens Type A Infection and Shedding in Healthy Humans and „Zebu” Cattle in Brasil. PhD Thesis, University of California, Davis 1974.
6. Bryan F. L.: J. Milk. Fd Tech. 32, 382, 1969.
7. Bryan F. L., McKinley T. W., Mixon E.: J. Milk Fd Tech. 34, 576, 1971.
8. Canada J. C., Strong D. H.: J. Bact. 89, 1623, 1965.
9. Cygan Z., Jastrzębski T.: Medycyna Wet. 25, 338, 1969.
10. Cygan Z., Jastrzębski T., Nowak J.: Medycyna Wet. 25, 70, 1969.
11. Dische F. E., Elek S. D.: Lancet 2, 71, 1957.
12. Duncan C. L., Strong D. H.: Infect. Immun. 3, 167, 1971.
13. Duncan C. L., Strong D. H.: J. Bact. 100, 86, 1969.
14. Duncan C. L., Sugiyama H., Strong D. H.: J. Bact. 95, 1560, 1968.
15. Egerton J. R., Walker P. D.: J. Path. Bact. 88, 275, 1964.
16. Genigeorgis C.: J. Am. vet. med. Ass. 167, 821, 1975.
17. Genigeorgis C., Sakaguchi G., Riemann H.: Appl. Microbiol. 26, 111, 1973.
18. Hall H. E., Angelotti R., Lewis K. H., Foter M. J.: J. Bact. 85, 1094, 1962.
19. Hauschild A. H. W.: Can. J. Microbiol. 16, 561, 1970.
20. Hauschild A. H. W., Nillo L., Dorward W. J.: Can. J. Microbiol. 16, 331, 1970.
21. Hauschild A. H. W., Nillo L., Dorward W. J.: Can. J. Microbiol. 16, 339, 1970.
22. Hauschild A. H. W., Thatcher F. S.: J. Fd Sci. 32, 467, 1967.
23. Hobbs B. C.: J. appl. Bact. 28, 74, 1965.
24. Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H., Cruickshank J. C.: J. Hyg., Camb. 51, 75, 1953.
25. Hobbs B. C., Sutton R. G. A.: Characteristics of Spores of Clostridium welchii in Relation to Food Hygiene, str. 51. The Anaerobic Bacteria, Ed. V. Fredette, Montreal 1967.
26. Kendall A. I., Smith R. M.: cyt. wg poz. 54.
27. Klein E.: cyt. wg poz. 54.
28. Larner H. B.: J. Am. med. Ass. 78, 276, 1922.
29. Lenkova W. I., Lenkova W. A.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 131, 8, 1965.
30. Loewenstein M. S.: New Engl. J. Med. 286, 1026, 1972.
31. McClung L. S.: J. Bact. 50, 229, 1945.
32. Meisel H., Tremblatier P., Pogorzelska B.: Med. dośw. 4, 359, 1960.
33. McKillop E. J.: J. Hyg., Camb. 57, 31, 1959.
34. McLennan J. D.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 60, 162, 1956.
35. McLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
36. Moran N., Torres — Anjel M. J., Wiggins A., Riemann H. P.: 7th Panamerican Cong. Vet. Med. and Animal Husb., Bogota, Colombia 1973.
37. Murrell T. G. C., Egerton J. R., Rampling A., Samels J., Walker P. D.: J. Hyg., Camb. 64, 375, 1966.
38. Murrell T. G. C., Roth L.: Med. J. Aust. 1, 61, 1963.
39. Naik H. S., Duncan C. L.: Appl. Environ. Microbiol. 34, 125, 1977.
40. Nakamura N., Schulze J. A.: A. Rev. Microbiol. 24, 359, 1970.
41. Narayan K. G.: Acta vet. hung. 16, 65, 1966.
42. Narayan K. G.: Acta vet. hung. 17, 179, 1967.
43. Narayan K. G., Takacs J.: Acta vet. hung. 16, 345, 1966.
44. Nelson C.: J. infect. Dis. 52, 89, 1933.
45. Nillo L.: Can. J. Microbiol. 23, 908, 1977.
46. Nillo L.: Can. J. Microbiol. 24, 633, 1978.
47. Oakley C. L.: Br. med. J. 12, 269, 1949.
48. Osterling S.: Nord. Hyg. Tidsk. 33, 173, 1952.

49. Schweinberg F. B., Sylvester E. M.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 527, 1953.
50. Shigemori O.: Jap. J. vet. Res. 14, 131, 1966.
51. Skjelkvale R., Uemura T.: J. appl. Bact. 42, 355, 1977.
52. Skjelkvale R., Uemura T.: J. appl. Bact. 43, 281, 1977.
53. Smith L. D.S.: The Growth of Clostridium perfringens in Food, str. 68. Int. Symp. on the Microbiology of Semipreserved meat, Prague 1970.
54. Smith L. D.S.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Ed. Ch. C. Thomas, USA 1975.
55. Smith L. D.S., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria, Ch. C. Thomas, USA 1968.
56. Stark R. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 4, 89, 1971.
57. Stark R. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 6, 662, 1972.
58. Sugitani A., Takamatsu S.: Jap. Publ. Hlth. J. 8, 661, 1961.
59. Sutton R. G. A.: J. Hyg., Camb. 64, 65, 1965.
60. Sutton R. G. A., Hobbs B. C.: J. Hyg., Camb. 66, 135, 1968.
61. Taylor C. E. D., Coetzee E. F. C.: Mon. Bull. Minist. Hlth. 25, 142, 1966.
62. Testas P., Wyplosz J., Vivier J., Chanzy M.: Nouv. Presse Med. 1, 2087, 1972.
63. Tsai C., Torres — Anjel M. J., Riemann H. P.: J. Formosan med. Ass. 73, 501, 1974.
64. Uemura T.: J. appl. Bact. 44, 411, 1978.
65. Uemura T., Genigeorgis C., Riemann H. P., Franti C. E.: Infect Immun. 9, 470, 1974.
66. Uemura T., Sakaguchi G., Riemann P.: Appl. Microbiol. 26, 381, 1973.
67. Uemura T., Skjelkvale R.: Acta path. microbiol. scand. 84, 414, 1976.
68. Willis A. T.: Clostridia of Wound Infection, Butterworth and Company, London 1969.
69. Yasukawa A., Okada Y., Kitashe T., Miyamoto S.: J. Fed Hyg. Soc. Jap. 18, 313, 1975.
70. Zeissler J.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I 154, 200, 1949.
71. Zeissler J., Rassfeld — Sternberg L.: Br. med. J. 12, 267, 1949.

Adres autorów: ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

ZOFIA PORADZISZ, JANINA SAWICKA

## Przydatność metody toluidynowej do oznaczania zawartości laktozy w mleku krów

Z Zespołu Przetwórstwa i Oceny Surowców Zwierzęcych Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR w Krakowie

Oznaczanie zawartości laktozy w mleku krów jest często wykonywane w laboratoriach przemysłu mleczarskiego oraz spożywczego, a ostatnio znalazło również zastosowanie w diagnostyce stanów zapalnych wymienia. Poziom laktozy w mleku jest zdaniem Rennera (7) miernikiem stanu zdrowotnego wymienia i można go stosować jako test diagnostyczny.

Stosowana dotychczas do oznaczania zawartości laktozy w mleku redukccyjna metoda Bertranda (6) jest bardzo czasochłonna i dość kosztowna ze względu na duże zużycie odczynników. Analizatory automatyczne typu IRMA, Mini-IRMA lub Milko-Scan z powodu wysokiej ceny nie są jeszcze w naszych laboratoriach powszechnie dostępne. W związku z tym istnieje potrzeba wprowadzenia szybkiej, dostatecznie dokładnej i taniej metody oznaczania zawartości laktozy w mleku krowim.

Warunki te spełniają metody fotometryczne. Są one oparte o pomiary ekstynkcji barwnego produktu kondensacji glukozy z o-toluidyną w środowisku kwasu octowego lodowatego. Reakcję kondensacji z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi, z których najodpowiedniejszą okazała się o-toluidyna, wykorzystali do oznaczania zawartości glukozy w płynach ustrojowych Ek i Hultman (2) oraz Hultman (3). Metodę tę stosuje się do dziś w laboratoriach klinicznych (1, 4, 5).

Steiger i Schulze (8) przystosowali tę metodę do oznaczania laktozy w małych próbkach mleka np. u loch i drobnych zwierząt laboratoryjnych, po zhydrolizowaniu laktozy do glukozy.

Praca niniejsza miała na celu zbadanie możliwości zastosowania metody toluidynowej do seryjnych oznaczeń zawartości laktozy w mleku krów oraz sprawdzenia jej dokładności i powtarzalności.

### Materiał i metody

W 170 próbkach pełnego mleka krowiego oznaczono zawartość laktozy równolegle metodą redukccyjną Bertranda i metodą toluidynową. W 85 próbkach (wariant A) stosowano metodę toluidynową według Steigera i Schulze (8), a w pozostałych 85 (wariant B) zwiększono 5-krotnie ilość mleka oraz wszystkich stosowanych odczynników. W wariacie B chodziło o zwiększenie dokładności oznaczania laktozy. Większa ilość mleka powinna dać zmniejszenie się błędów pomiaru oraz czasu wykonania oznaczenia, gdyż łatwiej jest odmierzyć większą próbkę do analizy. Przy badaniu mleka krów zwiększenie próbki nie odgrywa większej roli. W opisie metody podano w nawiasach zmodyfikowane ilości mleka i odczynników w metodzie określonej jako wariant B.

Do próbek wirówkowych zawierających po 1,0 ml (lub 5,0 ml) 3% w/v \*) kwasu trójchlorooctowego odmierzano mikropipetą po 0,02 ml (lub 0,1 ml) mleka i po wymieszaniu odwirowywano strącone białko. Do oznaczenia zawartości laktozy używano 0,5 ml klarownego płynu znad osadu. Do ślepej próby użyto 1,0 ml (lub 5,0 ml) kwasu trójchlorooctowego i 0,02 ml (lub 0,1 ml) wody destylowanej, a do kontrolnej 1,0 ml (lub 5,0 ml) kwasu trójchlorooctowego i 0,02 (lub 0,1 ml) 5% roztworu chemicznie czystej laktozy, wysuszonej w temperaturze +105°C, w 0,2% wodnym roztworze kwasu benzooesowego.

Dalszy tok postępowania jest dla obu wariantów jednakowy: do wysokich próbek laboratoryjnych pojemności 15 — 20 ml odmierzano po 3,5 ml odczynnika toluidynowego i po 0,5 ml klarownego płynu znad osadu po odwirowaniu z kwasem trójchlorooctowym.

Odczynnik toluidynowy sporządzano w następujący sposób: w 940 ml kwasu octowego lodowatego rozpuszczono 1,5 g tiomocznika i dodano 60 ml o-toluidyny. Wszystkie stosowane odczynniki muszą być cz. d. a., szczególną uwagę należy zwrócić na czystość i świeżość o-toluidyny.

Po wymieszaniu obu składników wstawiono próbki do łaźni wodnej o temperaturze wrzenia, w której pozostawiono je przez 10 min. Następnie schładzano próbki w wodzie z lodem, przenoszono do statywów i po upływie 20 min. oznaczano ekstynk-

\*) 3 g kwasu trójchlorooctowego w 10 ml roztworu.