

ANTONI JAKUBCZAK, JÓZEF MALESZEWSKI *

Przeżywalność *Yersinia enterocolitica* w mięsie wieprzowym w zależności od wielkości inoculum i temperatury zamrażania

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Nowogrodzka 160, 18-400 Łomża
* Samodzielna Pracownia Mikrobiologii i Biochemii Produktów Zwierzęcych
Instytutu Weterynarii, ul. Zamojskiego 15, 03-801 Warszawa

Summary

Survival of *Yersinia enterocolitica* in pork in relation to inoculum and temperature of freezing

The objective of the studies was to evaluate survival of *Yersinia enterocolitica* serotypes 0:3 and 0:9 in frozen pork meat. After 42 days storage of meat samples at -10°C and -20°C live cells of the bacterium were found when an inoculum contained 10^8 cells of *Y. enterocolitica*/g. *Y. enterocolitica* was not found after 28 days of storage of meat at -10°C and after 35 days of storage at -20°C when an inoculum contained 10^9 of bacterial cells/g. The results point to a better survival of *Y. enterocolitica* in pork meat stored at -20°C than in -10°C .

Dane piśmiennictwa wskazują, iż świeże mięso wieprzowe często bywa zanieczyszczone pałeczkami *Yersinia enterocolitica*. Wśród izolowanych szczepów znajdują się serotypy wywołujące zakażenia u ludzi (1, 3, 8, 9, 11, 13, 14). Zanieczyszczenie mięsa następuje najczęściej podczas wytrzewiania świń, u których gatunek ten występuje często jako normalny mieszkaniec jamy gębowej (1, 8, 10, 13, 14). Szereg autorów zwraca uwagę na istnienie bezpośredniego związku pomiędzy zachorowaniem u ludzi a spożyciem surowej wieprzowiny. Dotyczy to szczególnie krajów, gdzie mięso pod różnymi postaciami spożywane jest na surowo np. w Belgii (15). Ryzyko zakażenia tym drobnoustrojem wynika również z możliwości jego namnażania się oraz wytwarzania ciepłostajłej enterotoksyny w temperaturze $0-4^{\circ}\text{C}$ (3, 7, 9, 11, 16) oraz zdolności do przeżywania w mięsie mrożonym (2, 5, 7, 16). Badania własne wykazały obecność żywych komórek *Yersinia enterocolitica* serotyp 0:3 i 0:9 po 6 miesiącach mrożenia farszu wieprzowego w temp. -25°C , gdy dawka zanieczyszczająca wynosiła 10^9 komórek na 1 gram mięsa. Redukcja liczby żywych komórek bakterii wynosiła po tym okresie mrożenia o 4 D dla serotypu 0:3 i o 5 D dla szczepu należącego do serotypu 0:9.

Celem badań było sprawdzenie, po jakim czasie mrożenia i przy jakiej dawce początkowej nie stwierdza się żywych komórek *Yersinia enterocolitica* w mięsie wieprzowym.

Materiał i metody

Do badań użyto dwóch szczepów *Yersinia enterocolitica* należących do serotypów 0:3 i 0:9 wyizolowanych od świń rzeźnych (13). Szczepy te wykazały dodatnie cechy

wskazujące na ich potencjalną chorobotwórczość dla ludzi, tj. autoaglutynację w temp. 37°C wg (4, 12) zahamowanie wzrostu na agarze MOX (Magnesium oxolate agar) w temp. 37°C wg (6) oraz wytwarzały enterotoksynę w temp. 4°C i 20°C wg (3).

Doświadczenie wykonano w dwóch wariantach. W pierwszym — próbki mięsa wieprzowego (tylna szynka) pobranego bezpośrednio po uboju w ilości 20 g poddano zmieleniu i zakażono wcześniej przygotowaną płynną hodowlą TSB (Trypase Soy Broth) szczepów *Yersinia enterocolitica* o inoculum 10^4 i 10^9 komórek na 1 gram. Tak przygotowane mięso zamrażano w temp. -20°C . W drugim wariantcie, w ten sam sposób zakażone próbki mięsa poddano zamrożeniu w temp. -10°C . Po 24 godzinach oraz 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dniach mrożenia próbki mięsa rozmrażano, rozcieńczano dziesięciokrotnie i homogenizowano przez 1 min. w stomacherze, po czym, po dokonaniu kolejnych rozcieńczeń, posiewano bezpośrednio 0,1 ml homogenatu na *Yersinia Selective Agar* — Difco. Podłoże to inkubowano w temp. 28°C przez 24 godz. Typowo rosnące dla gatunku *Yersinia enterocolitica* kolonie liczono i ustalano miano dla poszczególnych serotypów. Dokonywano również identyfikacji kolonii, biorąc pod uwagę zdolność do wytwarzania ureazy, H_2S , dezaminacji fenylalaniny oraz rozkładu sacharozy. Testy te pozwalają potwierdzić przynależność do gatunku *Yersinia enterocolitica* mannitolododatnich kolonii wyrosłych na tym podłożu.

Wyniki i omówienie

Przeżywalność szczepów *Yersinia enterocolitica* w mięsie mrożonym w temp. -10°C i -20°C przy inoculum 10^4 /g mięsa żywych komórek podano w tab. 1. Analiza rezultatów wskazuje na większy spadek liczby żywych komórek podczas mrożenia w temp. -10°C niż -20°C . Dla szczepu należącego do serotypu 0:3 spadek ten wynosił z $1,4 \times 10^4$ /g do $1,3 \times 10^1$ /g po 6 tygodniach, a dla serotypu 0:9 z $1,3 \times 10^4$ /g do $7,0 \times 10^1$ /g również po tym samym czasie mrożenia. W temp. -20°C spadek był mniejszy i wynosił dla *Yersinia enterocolitica* 0:3 z $1,4 \times 10^4$ do $2,1 \times 10^2$ /g, a dla serotypu 0:9 z $1,3 \times 10^4$ /g na $8,0 \times 10^1$ /g. Wyniki wskazują także na nieco większą przeżywalność badanych szczepów w temp. -20°C niż w temp. -10°C . Szybkie i głębokie zamrożenie wpływa prawdopodobnie mniej destrukcyjnie na komórki *Yersinia enterocolitica* niż zamrażanie w wyższych temperaturach.

Rezultaty uzyskane po zastosowaniu inoculum 10^9 /g mięsa przedstawiono w tab. 2. Po 28 dniach mrożenia w temp. -10°C i 35 dniach w temp. -20°C nie wykryto w mięsie żywych komórek *Yersinia enterocolitica* serotyp 0:3. W przypadku *Y. enterocolitica* serotyp 0:9 nie stwierdzono żywych komórek po 42 dniach

Tab. 1. Przeżywalność *Y. enterocolitica* 0:3, 0:9 w temp. -10°C , -20°C przy inoculum 10^4 /g

Serotyp i inoculum	Temp.	Czas przechowywania (dni)						
		1	7	14	21	28	35	42
<i>Y. enterocolitica</i> 0:3 $1,4 \times 10^4$ /g	-10°C	$1,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^1$
	-20°C	$6,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
<i>Y. enterocolitica</i> 0:9 $1,3 \times 10^4$ /g	-10°C	$6,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$
	-20°C	$5,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^1$

Tab. 2. Przeżywalność *Y. enterocolitica* 0:3, 0:9 w temp. -10°C , -20°C przy *inoculum* $10^3/\text{g}$

Serotyp i <i>inoculum</i>	Temp.	Czas przechowywania (dni)						
		1	7	14	21	28	35	42
<i>Y. enterocolitica</i> 0:3 $1,0 \times 10^3/\text{g}$	-10°C	$2,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	—	—	—
	-20°C	$4,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	—	—
<i>Y. enterocolitica</i> 0:9 $1,7 \times 10^3/\text{g}$	-10°C	$7,6 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	—
	-20°C	$9,0 \times 10^2$	$7,3 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$

mrożenia w temp. -10°C , natomiast wykazano obecność po 42 dniach mrożenia w temp. -20°C . Spadek miana w porównaniu do dawki początkowej wynosił 2 D. W tym układzie doświadczenia potwierdzono również nieco większą przeżywalność badanych szczepów w mięsie mrożonym w temp. -20°C niż -10°C .

Różną przeżywalność *Y. enterocolitica* w mięsie w zależności od temperatury przechowywania wykazało szereg autorów (2, 5, 7, 9, 11, 16). Hanna i wsp. (9) po 28 dniach mrożenia mięsa wołowego w temp. -20°C nie stwierdzili obecności żywych komórek *Yersinia enterocolitica*, gdy zakażenie początkowe wynosiło $10^4/\text{g}$, natomiast przy początkowym zakażeniu 10^7 komórek na gram po 28 dniach stwierdzono redukcję tych bakterii o 4 D. EL-Zawahry i wsp. (5) w wołowinie przechowywanej w temp. -20°C przez 30 dni wykazali zniszczenie 83% komórek *Y. enterocolitica*. Na przeżywalność *Y. enterocolitica* przez długi okres czasu w mrożonej żywności wskazuje również Schiemann (16). Gill i Reichel (7) obserwowali wzrost *Yersinia enterocolitica* w wołowinie pakowanej w próżni i przechowywanej w temp. -2°C przez dwa miesiące.

Dane piśmiennictwa oraz wyniki własne wskazują na istnienie ryzyka zakażenia przy spożywaniu mięsa

wieprzowego zanieczyszczonego chorobotwórczymi dla człowieka szczepami *Yersinia enterocolitica* 0:3 i 0:9. Wynika to ze zdolności tego gatunku bakterii do przeżywania oraz wzrostu w temperaturach przechowywania mięsa.

Piśmiennictwo

- Andersen J. K.: Int. J. Fd Microbiol. 7, 193, 1988.
- Asakawa Y., Akamane S., Smitozawa K., Hanma T.: Contrib. Microbiol. Immunol. 5, 115, 1979.
- Bielecka Z., Jakubczak A., Andziak I., Stypułkowska-Misiurewicz H.: Med. Dośw. 41, 124, 1988.
- Doyle M. P., Hugdahl M. B., Taylor.: Appl. Environ. Microbiol. 42, 661, 1981.
- EL-Zawahry Y. A., Rowley D. B.: Appl. Environ. Microbiol. 37, 50, 1979.
- Gemski P., Lazere J. R., Casey T.: Infect. Immunol. 27, 682, 1980.
- Gill C. O., Reichel M. D.: Fd Microbiol. 6, 223, 1989.
- Fukushima H.: Jpn. J. Vet. Sci. 48, 183, 1986.
- Hanna M. O., Stewart J. C., Carpenter Z. L., Vanderzant: J. Fd Protect. 40, 689, 1977.
- Kapperud G.: Int. J. Fd Microbiol. 12, 53, 1991.
- Kleinlein N., Untermann F.: Int. J. Fd Microbiol. 10, 65, 1990.
- Laird W. J., Cavanaugh D. C.: J. Clin. Microbiol. 11, 430, 1980.
- Maleszewski J., Jakubczak A.: Medycyna Wet. 44, 734, 1988.
- Nesbakken T.: Int. J. Fd Microbiol. 6, 287, 1988.
- Tauxe R. V., Wauters G., Goossens V., Van Nogen R., Vandepitte J., Martin S. M., De Mol D., Thiers G.: Lancet 16, 1129, 1987.
- Schiemann D. A.: W: Foodborne Bacterial Pathogens. M. P. Doyle (Wyd.) Marcel Dekker, New York NY, 1989, s. 601.

Adres autora: dr Antoni Jakubczak, ul. Małachowskiego 5/20, 18-403 Łomża

ROZRÓD ZWIERZĄT

EDWARD MALINOWSKI, ANNA KŁOSSOWSKA, MAREK SZALBIERZ

Patogenność dla gruczołu mlekowego drobnoustrojów wyosobnionych z podklinicznych i klinicznych przypadków mastitis u krów

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Instytutu Weterynarii,
ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Summary

Pathogenicity for mammary gland of microorganisms isolated from clinical and subclinical bovine mastitis.

Clinical udder and laboratory milk samples examinations were performed in 2084 cows from 20 farms. There was found clinical and subclinical mastitis in 1791 quarters of 945 cows. The clinical mastitis was caused by *Str. agalactiae* (36,2%), *Staph. aureus* (14,0%), *Str. dysgalactiae* (12,1%), *Str. uberis* (10,1%), *E. coli* (8,2%), *Staph. epidermidis* (8,2%), *Micrococcus* sp. (3,8%), yeasts (1,9%) and other bacteria (5,3%). Agents of subclinical mastitis were: *Staph. epidermidis* (32,5%), *Micrococcus* sp. (19,9%), *Str. agalactiae* (15,3%), *Staph. aureus* (11,9%), *Str. uberis* (10,3%), *Str. dysgalactiae* (8,1%) and other microorganisms (2,0%).

(major pathogens) zaliczane są gronkowce złociste, paciorkowce bezmleczności, paciorkowce zaburzeń laktacyjnych i wymieniowe oraz pałeczki okrężnicy i niektóre inne bakterie gramujemne. Do grupy drugiej (minor pathogens) należą gronkowce koagulazoujemne, mikrokokki, maczugowce bydłce oraz drożdżaki (6, 7, 13, 16, 17, 23). Na likwidację *Staph. aureus* i *Str. agalactiae*, jako tzw. czynników zakaźnych (contagious), nastawione były dotychczasowe programy zwalczania mastitis (5, 6, 9, 17, 20, 26). Higiena pozyskiwania mleka, stosowanie jodoforów, szybka diagnostyka i leczenie zapaleń klinicznych oraz inlokacja preparatów o przedłużonym działaniu w okresie zasuszenia doprowadziły do poważnego ograniczenia zapaleń wywołanych przez te drobnoustroje. Na ich miejsce pojawiły się jednak kłopotliwe infekcje spowodowane przez bakterie śród-

Wśród drobnoustrojów patogennych dla gruczołu mlekowego krów wyróżnia się 2 grupy. Do pierwszej z nich