

STANISŁAW ZALESKI

PRZYPADEK MASOWEGO ZATRUCIA POKARMOWEGO

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH w Warszawie

W związku z dużą liczbą przypadków zatruc pokarmowych, etiologia których pozostaje nie wyjaśniona, w ostatnich latach badacze zwrócili uwagę na drobnoustroje, które dotychczas były uważane za niechorobotwórcze po spożyciu wraz z pokarmem. Jednym z nich jest laseczka zgorzeli gazowej, której typ F i odmiana typu A są zdolne do spowodowania zatruc.

Typ F laseczki zgorzeli gazowej jest pokrewny typowi B, od którego różni się mniejszą toksycznością, jak również zdolnością do produkowania przetrwalników o wysokiej ciepłooporności (1, 2). Przypadki zatruc na jego tle występowały po II wojnie światowej, głównie na terenie Niemiec północno-zachodnich (3, 4, 5, 6). Chociaż istnieją podejrzenia, że wywołane przez ten typ zatrucia występowały również, wprawdzie w rzadkich przypadkach, i na innych częściach kuli ziemskiej, to jednak przeprowadzona diagnoza bakteriologiczna w żadnym z podejrzanych przypadków nie była wystarczająca (7). Należy również zaznaczyć, że przypadki te miały raczej charakter sporadyczny.

Podejrzenie, że laseczka zgorzeli gazowej typu A może również być przyczyną zatruc pokarmowych istniały już dawno (8, 9, 10, 11), dopiero jednak badania Hobbs i współpracowników (12), przeprowadzone w 1953 roku, dowiodły roli tego drobnoustroju w patogenie zatruc pokarmowych. Badacze ci stwierdzili, że laseczki zgorzeli gazowej typu A, tworzące wysoce ciepłooporne przetrwalniki, posiadają właściwości chorobotwórcze po wtargnięciu do przewodu pokarmowego człowieka. W obserwowanych przez nich przypadkach stałą przyczyną zachorowań z powodu tego drobnoustroju były przetwory mięsne spożywane po okresie kilkunastogodzinnego przechowywania w nieodpowiednich warunkach. W tym czasie następowało silne namnożenie laseczek zgorzeli gazowej i chociaż na podstawie badań przesączów jak i pełnych hodowli bakteryjnych nie udało się stwierdzić nowej toksyny, to jednak spożycie produktów zakażonych tymi bakteriami powodowało powstawanie łagodnych zaburzeń żołądkowo-jelitowych.

Szczepy laseczki zgorzeli gazowej wyosobnione z przypadków zatruc Hobbs i współpr. (12) namnażali na produktach mięsnych i podawali do spożycia ochotnikom spośród ludzi i zwierzętom. O ile u ludzi obserwowano typowe dla tej bakterii objawy zatrucia, o tyle u zwierząt nie stwierdzono żadnej reakcji.

Hobbs i współpr. (12) przypuszczają również, że każdy pokarm mięsny, w którym nastąpiło silne namnożenie tej bakterii, może być uważany za grożący wywołaniem zatrucia. W przypadku natomiast wystąpienia zatrucia, gdy w pokarmie i kale osób chorych nie stwierdzi się innego

czynnika etiologicznego uzasadniającego chorobę, należy za taki — według tych autorów — uznać wysoce ciepłoporną laseczkę zgorzeli gazowej.

PRZYPADEK MASOWEGO ZATRUCIA, WYWOŁANEGO PRZEZ LASECZKI ZGORZELI GAZOWEJ

Opis przypadku masowego zatrucia pokarmowego. W stołówce przyzakładowej podano w lecie na obiad rosół i mięso wołowe polane sosem chrzanowym, zrobionym na rosole. Ze względu na przeciążenie personelu stołówki pracą obiad został ugotowany w godzinach wieczornych poprzedniego dnia. W dzień obiadu tak rosół, jak i mięso tylko podgrzano i podano stołownikom. Obiad spożyło ok. 300 osób, spośród których ponad 200 zachorowało. Pierwsze zachorowania wystąpiły po ok. 10—12 godzinach od chwili spożycia, przy czym najdłuższy okres wylegania zatrucia trwał ok. 20 godzin. Objawy charakteryzowały się pojawieniem nagłej biegunki i bóli żołądkowych; nie obserwowano natomiast nudności, wymiotów, jak również podwyższenia ciepłoty ciała. Nasilenie objawów chorobowych u poszczególnych osób cechowało się dużą indywidualnością — ilość wypróżnień u poszczególnych osób wahała się od jednego do kilkunastu, której to ilości odpowiednio towarzyszyło nasilenie bólów żołądkowych.

Spśród osób, które zachorowały, pobrano metodą próbek losowych, w dniu wystąpienia objawów chorobowych, próbki kału do badań bakteriologicznych. Równocześnie poddano takiemu badaniu przechowywane w lodówce próbki spożytego obiadu.

Badanie bakteriologiczne spożytych produktów. Wykonano badanie bakteriologiczne wszystkich dań wchodzących w skład obiadu, za podejrzone uznano jednak tylko mięso i sos chrzanowy.

Preparaty bezpośrednie tak z mięsa, jak i z sosu wykazały laseczki Gram-dodatnie. Posiewy na podłoże Wrzoska z dodatkiem 1% glikozy wykazały wzrost laseczek Gram-dodatnich, rozkładających glikozę z intensywnym tworzeniem gazu. Posiew bezpośredni mięsa na agar z krwią i glikozą metodą Fortnera oraz agar z krwią w warunkach tlenowych wykazał wzrost prawie czystej hodowli bakteryjnej. Kolonie na agarze z krwią w warunkach beztlenowych przy posiewie bezpośrednim nie posiadały właściwości hemolitycznych, w dalszych przesiewach nabierały tej cechy. Z posiewu bezpośredniego uzyskano kolonie małe, o średnicy 2—3 mm, szorstkie, o nieregularnych brzegach. Po 3—4 pasażach średnica ich zwiększyła się do 5 mm i przechodziły w gładkie, o brzegach nie postrzępionych, z lekkim wzniesieniem w środku. W warunkach tlenowych wzrostu nie stwierdzono.

Badania biochemiczne wysobnionych szczepów wykazały, że rozkładają one glikozę, maltozę, laktozę i sacharozę; nie miały natomiast tej zdolności w stosunku do mannitolu i salicyny. Równocześnie powodowały one gwałtowne ścinanie mleka z wytworzeniem skrzepu zajmującego 1/3 objętości podłoża.

Badania na ciepłoporność przetrwalników znajdujących się w mięsie i sosie przeprowadzono przez włożenie do jednego szeregu próbek z podłożem Wrzoska po ok. 1 grama rozdrobnionego mięsa, do drugiego

natomiast po 1 ml sosu chrzanowego. Bezpośrednio po wykonaniu posiewów podgrzewano je na łaźni wodnej w temp. 100° przez 1, 2, 3 i 4 godziny, a następnie posiewy umieszczono w cieplarni o temp. 37°. Tak z posiewów mięsa, jak i sosu otrzymano wzrost bakterii we wszystkich próbkach. Wyosobnione przy próbie na ciepłooporność komórki bakteryjne okazały się w dalszych badaniach identyczne z bakteriami otrzymanymi z posiewów bezpośrednich.

Z uzyskanych hodowli bakteryjnych wykonano preparaty barwione metodą Grama oraz preparaty negatywne podbarwione fuksyną dla stwierdzenia obecności otoczek. Równocześnie zatopioną w kapilarze pasteurowskiej hodowlę płynną oglądano pod mikroskopem i nie stwierdzono ruchu własnego.

Na podstawie cech morfologicznych komórek bakteryjnych, które były typowe dla laseczki zgorzeli gazowej. wyglądu kolonii, właściwości biochemicznych oraz ciepłooporności przetrwalników uznano, że badane szczepy są laseczkami zgorzeli gazowej.

Badanie bakteriologiczne kału osób chorych. Do badań pobrano kał od 19 osób. Badania były przeprowadzane równoległe przez Zakład Bakteriologii PZH na obecność pałeczek z rodzaju *Salmonella* i *Shigella* oraz przede mnie na obecność laseczek zgorzeli gazowej. Mimo przeprowadzenia szczególnie dokładnych badań, w pobranych próbach nie udało się wykazać pałeczek z rodzaju *Salmonella* i *Shigella*, we wszystkich natomiast stwierdzono obecność laseczek zgorzeli gazowej, wytrzymujących 4-godzinne ogrzewanie w łaźni wodnej w temp. 100°.

Badanie kału na obecność wysoce ciepłoopornych laseczek zgorzeli gazowej wykonywano przez posianie ok. 1 grama rozartego kału na podłoże Wrzoska z dodatkiem 1% glikozy, następnie posiewy podgrzewane przez 1, 2, 3 i 4 godziny w łaźni wodnej w temp. 100°. W danym przypadku we wszystkich posiewach stwierdzono, po 18-godzinnym ich przetrzymywaniu w temp. 37°, wzrost z wydzieleniem obfitej ilości gazu. Z 18-godzinnej hodowli wykonywano kolejno rozcieńczenia 1:1 000 i 1:10 000, z których 2 — 3 krople wysiewano do podłoża Wilson-Blaira dla beztlenowców. Wyrosłe pojedyncze kolonie o kształcie soczewkowatym, dookoła których występowało szernienie podłoża, przesiewano na bulion cukrowy, na którym uzyskiwano wzrost po 5 — 6 godzinach. Tego samego dnia wykonywano rozcieńczenia badanej hodowli. Do 3 próbek nalewano po 5 ml roztworu fizjologicznego chlorku sodowego i do pierwszej dodawano 2 krople hodowli. Po dokładnym zmieszaniu zawartości przenoszono z niej 2 krople do następnej i w podobny sposób postępowano przy wykonywaniu kolejnego rozcieńczenia. Zawartość próbki 2 i 3 wysiewano pipetą pasteurowską do agaru zwykłego z dodatkiem 0,1% glikozy, który uprzednio rozlewano do zatopionych na jednym końcu cienkich rurek. Przy tej metodzie posiewu rozcieńczeń na słupku agaru o wysokości 5 — 7 cm uzyskiwano po 18 godzinach wzrost kilku białych, soczewkowatych i oddzielnie rosnących kolonii. Wyjałowione od zewnątrz alkoholem rurki przepikowywano tuż nad miejscem wzrostu kolonii i kolonię bakteryjną przesiewano na bulion z glikozą. W ten sposób przesiewano szczep 6 — 10 razy i kontrolowano następnie jego czystość posiewami na agar z krwią i cukrem metodą Fortnera oraz w warunkach tlenowych. W przypadku ujemnej kontroli tlenowej i czystego wyglądu preparatu bezpośredniego szczep laseczki

zgorzeli gazowej posiewano na papkę mózgową Hiblera, na której obserwowano go przez 5 dni. Pierwsze 2 dni posiew przebywał w temp. 37°, a następne 3 dni w temperaturze pokojowej. Jeżeli w tym okresie nie wystąpiło szernienie papki mózgowej, szczep uznawano za czysty. W przypadku natomiast dodatknej kontroli tlenowej lub szernienia papki mózgowej, szczep czyszczono w dalszym ciągu przez wielokrotne przesiewanie przez wysoki słupek agarowy i podłoże płynne do czasu uzyskania czystej hodowli.

Z 19 badanych kałów wyosobniono 19 szczepów, które nie różniły się w wyglądzie kolonii, w cechach morfologicznych, biochemicznych i ciepłoporności przetrwalników od szczepów wyosobnionych z mięsa i sosu chrzanowego; określono je również jako laseczki zgorzeli gazowej.

T o k s y n y w y o s o b n i o n y c h s z c z e p ó w. Laseczki zgorzeli gazowej są zdolne do produkowania szeregu toksyn. *Hobbs* i współpr. (12) wykazali, że wysoce ciepłoporna odmiana typu A laseczki zgorzeli gazowej produkuje stale w małych ilościach toksynę alfa (lecytynazę) oraz tylko niektóre szczepy toksynę kappa (kolagenazę) lub hialuronidazę.

Toksyna alfa posiada działanie różnorodne: przy wprowadzeniu dożylnym w odpowiedniej dawce powoduje śmierć zwierzęcia, wprowadzona śródskórnje powoduje martwicę skóry oraz tak *in vivo*, jak *in vitro*, działa hemolizująco. W pracy tej lecytynazę, która według badań *MacFarlane* i *Knighta* (13) jest odpowiednikiem toksyny alfa oznaczano reakcją lecytowitelinową (L. V.), opisaną przez *MacFarlane*, *Oakley* i *Andersona* (14), jak również określanie właściwości hemolitycznych przesączów bulionowych w obecności buforu boranowego z dodatkiem 0,05 M chlorku wapniowego.

Obecność toksyny beta (letalna, nekrotyzująca), która występuje u typów B, C i F oraz toksyny epsilon (nekrotyzująca, letalna), właściwej dla typów B i D wykluczano szczepieniem śródskórnym świńek morskich.

Toksynę teta (hemolityczną) określano mianowaniem hemolizyn obecnych w przesączu w obecności buforu fosforanowego metodą podaną przez *van Heyningena* (15).

Obecność toksyny kappa, którą *MacFarlane* i *MacLenan* (16, 17) określili jako kolagenazę, oznaczano domięśniowym wprowadzaniem przesączu 18-godzinnej hodowli bakteryjnej.

Badanie przesączu na obecność hialuronidazy przeprowadzono wykonując próbę ACRA (próba z czerwienią Kongo, kwaśnym alkoholem i końskim płynem synowialnym) według metody podanej przez *Oakley* i *Warrack* (18).

Badania wszystkich szczepów wykazały, że nie różniły się one w zdolności produkowania toksyn; tak szczepy wyosobnione od ludzi, jak i z pokarmu wytwarzały nieznaczne ilości toksyny alfa i hialuronidazy, żaden natomiast nie produkował toksyny beta, epsilon, teta i kappa.

W ł a ś c i w o ś c i s e r o l o g i c z n e w y o s o b n i o n y c h s z c z e p ó w. W swych badaniach *Henderson* (19) udowodnił, że antygen somatyczny laseczki zgorzeli gazowej typu A wykazuje dużą różnorodność. Zostało to potwierdzone badaniami *Meisla* (20), który uważa, że w obrębie typu A istnieje szereg ras antygenowych, sobie niepokrewnych. Równocześnie *Hobbs* i współpr. (12) uważają, że stwierdzenie w dużym procencie badanych kałów osób chorych wysoce ciepłopornych laseczek zgorzeli gazowej tej samej rasy serologicznej jest wystar-

czającym dowodem do uznania, że dane zatrucie zostało wywołane przez tę bakterię. Celem stwierdzenia czy między wyosobnionymi szczepami istnieje powinowactwo antygenowe sporządzono surowice odpornościowe na królikach. Sposób ich przygotowywania był zgodny z metodyką podaną przez *Hendersona* (19). Szczepy hodowano przez noc w temp. 37° na bulionie z glikozą, a następnie bakterie przemywano dwukrotnie roztworem fizjologicznym chlorku sodowego i zawieszano w wodzie destylowanej. Przed użyciem zawiesinę podgrzewano przez 1 godzinę przez 3 dni, a potem przez 2 dni działano 0,4% formaliną. Króliki szczepiono wzrastającymi dawkami zawiesiny bakteryjnej 6 razy z przerwami 3 — 4-dniowymi.

Aglutynację szkiełkową wykonywano z surowicami rozcieńczonymi 1:5 i stwierdzono, że wszystkie szczepy tak z żywności, jak i z kałów aglutynują ze wszystkimi surowicami.

Aglutynację próbkową wykonywano jak przy pałeczkach z rodzaju *Salmonella* z antygenem Vi i stwierdzono, że wszystkie szczepy heterologiczne aglutynują z daną surowicą do miana właściwego dla szczepu homologicznego.

Na podstawie otrzymanych wyników uznano, że wyosobnione szczepy laseczki zgorzeli gazowej typu A, wykazujące wysoką ciepłoporność, nie różniące się w wyglądzie morfologicznym, właściwościach biochemicznych i toksynotwórczych oraz wykazujące powinowactwo antygenowe były przyczyną zatrucia pokarmowego.

Próby skarmiania zwierząt wyosobnionymi szczepami. Spośród wyosobnionych szczepów do skarmiania szczurów użyto trzy, otrzymane z kału osób chorych. Do namnażania bakterii używano podłoża Wrzoska z dodatkiem 1% glikozy, 0,1% glikozy oraz podłoża Vf. Bakterie namnażano na tych podłożach przez 18 godzin, po czym podawano je 3-miesięcznym, białym szczurom tak w postaci pełnych hodowli, jak też płynu znad odwirowanego osadu. Każdy szczur po uprzednim 12-godzinnym głodzeniu otrzymał jednorazowo zgłębnikiem 2 ml badanej substancji bezpośrednio do żołądka.

Do badania każdej hodowli lub płynu znad osadu użyto 6 szczurów. Żaden z nich po skarmieniu nie wykazywał objawów chorobowych ani też rozluźnienia kału.

Z każdej partii badanych szczurów usypiano po 2 w odstępach 24-godzinnych z tym, że pierwsze dwa usypiano po upływie 18 godzin od chwili skarmienia. Uśpione szczury poddawano oględzinom anatomopatologicznym.

Zmiany anatomopatologiczne u skarmionych szczurów były nieregularne i w razie ich wystąpienia lokalizowały się w 1/3 końcowego odcinka jelita cienkiego. Ich nasilenie wykazywało duże indywidualne wahania od braku zmian do punkcikowatych wybroczyn, co można tłumaczyć indywidualną wrażliwością użytych szczurów. Należy również zaznaczyć, że wystąpienie zmian anatomopatologicznych uzyskiwano częściej po hodowli szczepów na podłożu Vf, przy czym najwyraźniejsze zmiany występowały u szczurów uśpionych na 2. lub na 3. dzień po skarmieniu. Zasadniczych różnic w obrazie anatomopatologicznym jelit po podaniu pełnych hodowli i ich przesączów nie stwierdzono, co pozwala przypuszczać, że działający czynnik toksyczny miał charakter egzotoksyczny.

Równocześnie te same, nie zakażone podłoża wprowadzono szczurom kontrolnym, obserwowano je klinicznie oraz usypiano równocześnie z szczurami skarmionymi. U żadnego z nich przyżyciowo jak też pośmiertnie zmian nie stwierdzono.

C. Zaleski

СЛУЧАЙ МАССОВОГО ПИЩЕВОГО ОТРАВЛЕНИЯ

Описан случай массового пищевого отравления, которое выступило вследствие теплоупорных палочек газовой гангрены типа А.

Бактериологические и серологические исследования выделенных штаммов из потребленной еды и экскрементов заболевших оказались тождественны.

Употребляя выделенные штаммы произведены были исследования на экспериментальных животных. Исследования привели к положительным результатам.

S. Zaleski

A CASE OF MASS FOOD POISONING

Mass food poisoning caused by a highly heat-resistant bacillus perfringens type A is described.

Bacteriological and serologic examination of strains isolated from the consumed food and feces of the persons affected have shown the identity of the strains.

Employing the isolated strains tests were carried out on experimental animals. Positive results were not obtained.

PIŚMIENNICTWO

1. Oakley C. L.: Brit. Med. J., (i), 269, 1949. — 2. Zeissler J, Rassfeld-Sternberg L.: Brit. Med. J., (i), 267, 1949. — 3. Beckermann F., Laas: Arztl. Wochenschrift, 1, 239, 1946, — 4. Jeckeln E.: Deutsche Med. Wochenschrift, 72, 105, 1947. — 5. Jeckeln E.: Deutsche Med. Wochenschrift., 73, 177, 1948. — 6. Willich G.: Deutsche Med. Wochenschrift., 74, 1339, 1949. — 7. MacLenan J. D.: Ann. New York Ac. Sc., 66, 162, 1956. — 8. Andrewes F. W.: Lancet, 8, 1899. — 9. Kendall A. J., Smith R. M.: Boston Med. Surg. J., 164, 306, 1911. — 10. Klein E.: Centrbl. Bakt. I. Orig., 18, 737, 1895.

11. McClung L. S.: J. Bact., 50, 229, 1945. — 12. Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H., Cruickshank J. C.: J. Hyg., 51, 75, 1953. — 13. MacFarlane R. S., Knight B.C.J.G.: Biochem. J., 35, 884, 1941. — 14. MacFarlane R. G., Oakley C. L., Anderson C. G.: J. Path. Bact., 52, 99, 1941. — 15. van Heyningen W. F.: Biochem. J., 35, 1246, 1941. — 16. MacFarlane R. C., MacLenan J. D.: Lancet, II, 301, 1945. — 17. MacFarlane R. G., MacLenan J. D.: Lancet, II, 328, 1945. — 18. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact., 63, 45, 1951. — 19. Henderson D. W.: J. Hyg. 40, 501, 1940. — 20. Meisel H.: Med. Dośw. i Społ., 25, 89, 1946.

Otrzymano: dn. 2.VI.1959 r.

Adres autora: PZH, Warszawa, ul. Chocimska 24.