

MICROBIOLOGIA INTOXICAȚIILOR ALIMENTARE

Intoxicațiile alimentare sunt boli acute necontagioase, care se declanșează în urma consumului de alimente masiv contaminate cu anumite specii de microorganisme și toxinele lor.

Se disting intoxicații de origine microbiană și otrăviri nemicrobiene.

Intoxicațiile alimentare de origine microbiană se împart în: toxiinfecții; toxicoze (bacteriene și micotoxicoze); mixte.

67.1. TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE

67.1.1. Definiție și etiopatogenie

Toxiinfecțiile alimentare sunt boli acute declanșate de consumul alimentelor care conțin cantități mari de celule vii ale agentului patogen specific și ale endotoxinelor concentrate în produs prin moartea microbilor.

Condiția principală pentru dezvoltarea toxiinfecției alimentare este multiplicarea prealabilă a agentului patogen până la concentrații de 10^7-9 bacterii/g de produs. Pătrunderea în tractusul digestiv a unor doze mari de agenți vii și a endotoxinei lor cauzează un sindrom de gastroenterită. În tractusul digestiv are loc multiplicarea ulterioară a agentului și simultan moartea unui număr mare de bacterii cu eliberarea endotoxinei, care se absoarbe din intestin și determină manifestările clinice.

Toxiinfecțiile alimentare trebuie diferențiate de bolile infecțioase cu poartă de intrare digestivă (ferba tifoidă, dizenteria ș. a.). Deși în ambele cazuri ingerăm microbi vii, pentru declanșarea unei boli infecțioase este suficient ca împreună cu alimentele să pătrundă o cantitate relativ mică de bacterii, care însă datorită virulenței lor particulare, se multiplică intensiv cauzând un proces patologic specific cu simptome clinice caracteristice.

Toxiinfecțiile alimentare sunt urmarea nerespectării normelor sanitare și a procesului tehnologic de preparare a alimentelor. Comparativ cu bolile infecțioase transmise pe cale alimentară, particularitățile toxiinfecțiilor alimentare sunt următoarele:

- se declanșează acut pe fondul unei sănătăți depline;
- au perioada de incubație comparativ scurtă (de regulă, câteva ore);
- afectează simultan un număr mare de persoane care au consumat același produs alimentar;
- au evoluție scurtă și se termină, de regulă, cu însănătoșire;
- nu au răspândire epidemică: boala nu se transmite de la bolnav la sănătos;
- lipsește starea de portaj îndelungat;

■ simptomele clinice de bază sunt voma și diareea.

Agenții care cauzează toxiinfecții alimentare fac parte din grupul bacteriilor potențial patogen: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, serovarurile diareigene de *E. coli*, *B. cereus*, *C. perfringens* tip A, *E. faecalis* cu variantele *liquefaciens* și *zymogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, precum și bacterii din genurile *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* ș. a.

67.1.2. Agenții etiologici ai toxiinfecțiilor alimentare: biologia, izolarea și identificarea lor

Genul Proteus. Bacili gramnegativi, necapsulați, cu flageli și pili peritrichi. Se dispun solitar, în perechi sau lanțuri scurte. Particularitatea lor principală este creșterea serpinginoasă (câțărătoare) pe mediile solide. După însămânțare în centrul plăcii cu geloză, cultura invadează, progresiv, cu un văl toată suprafața mediului.

Cauză a toxiinfecțiilor alimentare cu *Proteus* pot fi fabricatele din carne tocată, peștele, salatele din legume, vinegretetele, diverse garnituri.

Cultura pură de *Proteus* se obține prin însămânțarea produsului în apa de condensare a pantei de geloză după metoda Schukevici. Se pot utiliza și medii selective cu inhibitori ai florei de asociație. Identificarea culturii pure se efectuează prin studierea caracterelor biochimice: producerea de urează, fenilalanindezaminază, ornitindecarboxilază, indol, hidrogen sulfurat, fermentarea zaharurilor (tabelul 67.1).

Enterococii aparțin genului *Enterococcus* și fac parte din grupul D Lancefield al streptococilor. Sunt coci ovali, dispuși în perechi sau lanțuri scurte, uzual imobili, gram-pozitivi.

Toxiinfecții apar după consumul produselor lactate și a preparatelor din carne tocată contaminate cu enterococi în concentrații mari.

Izolarea culturii pure se efectuează prin însămânțarea pe medii selective cu polimixină, cristal violet. Rezultate bune se obțin pe mediul Slanetz-Bartley cu azid de sodiu și clorură de trifeniltetrazoliu. Pe acest mediu apar colonii mici, rotunde, bombate, de culoare vișinie-închis. După verificarea caracterelor morfotinctoriale, pe frotiu colorat Gram se testează catalaza. Enterococii sunt catalazonegativi.

Tabelul 67.1. Diferențierea principalelor specii de *Proteus*

Teste	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>
Uează	+	+
Fenilalanindezaminază	+	+
Ornitindecarboxilază	—	—
Indol	+	—
Hidrogen sulfurat	+	+
Fermentarea maltozei	+	—

Identificarea se bazează pe următoarele teste: creșterea în bulion bilit 40%, la pH 9,6, în medii cu 6,5% NaCl, precum și la temperaturile critice de 10 și 45°C. Identificarea biochimică poate fi completată și cu identificarea antigenică.

Bacillus cereus este un bastonaș mare, grampozitiv, sporogen, mobil, necapsulat, dispus în lanțuri scurte. Izbucniri de toxiinfecții alimentare apar după consumul de pâjoale, diferite garnituri, înghețată, uneori și a produselor de patiserie.

Crește pe medii uzuale. În bulion crește difuz cu sediment floconos și o peliculă la suprafață. Pentru izolare este mai util mediul selectiv hiperclorurat cu polimixină și clorură de trifeniltetrazoliu. Pe acest mediu, după 24—96 ore la 30°C, apar colonii roșii-rubinii, mari, rugoase, cu margini dantelate.

Identificarea se bazează pe caracterele morfotinctoriale și de cultivare (colonii R hemolitice), și biochimice (producere de lecitinază și absența fermentării manitei).

Vibrio parahaemolyticus a fost izolat pentru prima dată în 1963 de savanți japonezi. Este un microorganism larg răspândit în apele mărilor și oceanelor, deseori este izolat din produse alimentare de origine marină (pește, stridii, crabi, crevete, moluște). Poate cauza toxiinfecții alimentare. Au fost descrise toxiinfecții cu *V. parahaemolyticus* în urma utilizării unor legume murate (castraveți, varză).

Este un vibrion gramnegativ, monotrich, foarte mobil, fără capsulă, nesporulat. Crește pe medii cu concentrație sporită de NaCl (3—7%) și la pH 7,8—8,2. Toxiinfecții alimentare sunt cauzate mai frecvent de serovarurile O4:K12 și O4:K8.

Izolarea culturii pure se face prin însămânțarea produsului pe mediu diferențial, o geloză alcalină și salină, cu zaharoză, penicilină și albastru de metilen. Culoarea mediului este albastră-verzuie. Pe acest mediu vibrionii formează colonii rotunde, bombate, semi-transparente, cu suprafața umedă și lucioasă. Câteva colonii suspecte sunt repicate în apă peptonată 1% clorură de sodiu, care este incubată 18—24 ore la 37°C. Pe suprafața mediului se formează o peliculă din care se pregătesc preparate umede între lamă și lamelă, pentru a observa mobilitatea, și frotiuri colorate Gram.

V. parahaemolyticus este oxidazopozitiv (coloniile se colorează în cafeniu-vișiniu la aplicarea reactivului dimetilparafenildiamină); nu fermentează zaharoza, lactoza; crește în medii cu 3—8% clorură de sodiu, dar nu și în cele cu 0,5 și 10%; decarboxilează lizina și ornitina; produce indol, nu produce hidrogen sulfurat; este hemolitic și nu produce acetilmetilcarbinol.

Genul Citrobacter. Bacili mici, gramnegativi, mobili, nesporulați, necapsulați. Sunt comensali în intestinul omului sănătos. Unele serovaruri pot cauza toxiinfecții alimentare după consumul salatelor și vinegretelor contaminate.

Cresc bine pe medii uzuale și pot utiliza citratul ca unică sursă de carbon. Spre deosebire de *E. coli* nu sunt inhibați pe medii cu săruri biliare și verde de briliant.

Pentru identificare se studiază caracterele biochimice: cresc pe mediul cu citrat (Simmons), nu produc fenilalanindezaminază, lizindecarboxilază și nici acetilmetilcarbinol, dau reacția cu roșu metil pozitivă, degradează zaharurile cu producere de acid și gaz.

Uncle specii pot fi identificate prin aglutinare pe lamă cu serurile anti-O și anti-H corespunzătoare.

Yersinia enterocolitica. Bacterii ovoide, gramnegative, mobile numai la 22—29°C, nesporulate, posedă capsulă. Poate fi depistată în lapte, înghețată, carne.

Crește pe medii uzuale formând colonii mici, care cresc în dimensiuni peste 48 ore la 22—29°C. *Y. enterocolitica* produce endotoxină, iar unele serovaruri produc enterotoxină termostabilă.

Identificarea se face prin aglutinare cu seruri imune și prin studierea caracterelor biochimice. *Y. enterocolitica* scindează ureea, fermentează zaharoza, decarboxilează ornitina, nu produce H₂S, nu utilizează citratul.

Klebsiella. Bacili gramnegativi, imobili, cu pili peritrichi, nesporulați, au o capsulă bine dezvoltată.

Relativ rezistenți la factorii mediului, pot fi depistați în sol, apă, pe legume, în produsele lactate.

Cultivă pe mediile diferențiale Endo, Ploskirev. Formează colonii mari, mucoide, bombate, confluențe, lactozopozitive.

Identificarea se face prin aglutinare cu seruri imune și prin studierea caracterelor biochimice. Klebsielele degradează zaharurile cu formare de acid și gaz, utilizează citratul, scindează ureea, decarboxilează lizina, nu produc indol și H₂S, nu dezaminează fenilalanina, produc acetilmetilcarbinol, dau reacție negativă cu roșu metil.

67.2. TOXICOZELE BACTERIENE

Toxicozele bacteriene sunt boli acute declanșate prin consumul alimentelor care conțin exotoxină concentrată în ele după dezvoltarea agentului specific. În aceste cazuri agenții vii pot fi prezenți chiar și în concentrații mici.

67.2.1. Toxicoze cauzate de stafilococi

Staphylococcus aureus este agent potențial al unor intoxicații alimentare prin enterotoxina pe care o produce în 6 variante antigenice: A, B, C, D, E, F. Enterotoxina stafilococică este termorezistentă: la fierbere, în funcție de condițiile experimentului, se inactivează lent între 10 și 40 minute.

Intoxicațiile se declanșează mai frecvent după consumul laptei și a unor produse lactate, produse de patiserie cu cremă, a cărnii și produselor din carne, mai ales tocată. În produsele acidolactice această enterotoxină nu se acumulează, pentru că dezvoltarea stafilococilor este inhibată de acidul lactic.

Stafilococii fiind răspândiți pretutindeni, pericol poate prezenta orice produs în care s-au multiplicat stafilococi până la concentrații de 10^{5-7} UFC/g. Un asemenea produs poate fi nemodificat organologic, însă el este periculos prin concentrația enterotoxinei.

Stafilococii cultivă pe geloză hiperclorurată cu lapte sau cu lapte și ou, în care concentrația crescută de clorură de sodiu inhibă dezvoltarea microflorei asociate. Cultura izolată se identifică după schema uzuală.

Prezența enterotoxinei atât în produsul alimentar, cât și în culturile izolate se determină prin reacția de precipitare în gel cu serurile imune antitoxice A, B, C, D, E și F. Ca antigen servește extractul din produsul alimentar și filtratul culturii de stafilococi crescuți în bulion peptonat.

Se poate efectua și reacția de hemaglutinare indirectă, în care utilizăm eritrocite cu anticorpi anti-enterotoxină adsorbiți pe suprafață. În lipsa acestor reactivi este utilă proba biologică: produsul suspectat sau filtratul culturii izolate se administrează per os la motănași sau cățeluși de 1—1,5 luni. În interval de 30—60 minute enterotoxina stafilococică determină vomă și diaree. Animalele se însănătoșesc o dată cu eliminarea toxinei din organism.

67.2.2. Toxicoze cauzate de *C. botulinum*

Toxina botulinică determină intoxicații severe, cu un procent considerabil de cazuri letale.

C. botulinum habitează în intestinul animalelor, păsărilor, peștilor, de unde, cu fecalele, ajunge în mediul înconjurător și impurifică solul și produsele alimentare.

Este un bastonaș gram pozitiv, peritrich, necapsulat, cu spori subterminali ovali.

Botulismul, în absoluta majoritate a cazurilor, apare după consum de alimente: conservate în casă, ciuperci murate și marinate, jambon, pește afumat, cârnați ș. a. Sterilizarea inefficientă a acestor conserve permite germinarea ulterioară a sporilor de *C. botulinum* cu acumularea toxinei botulinice în aliment, iar consumul lor fără prelucrare termică ulterioară lasă activă toxina.

C. botulinum este un anaerob strict, se dezvoltă la temperatura de 28—35°C. În coloana de geloză glucozată formează colonii translucide cu periferia mai opacă; examinate sub lupă aceste colonii apar ciuruite cu mici bule de gaz.

Antigenic bacilul botulinic este omogen, dar toxina produsă are 7 serovaruri: A, B, C, D, E, F și G. Boala este cauzată mai frecvent de serovarurile A, B sau E. Toxina botulinică este termosensibilă (distrușă în două minute la temperaturi între 90 și 60°C sau mai puțin, în funcție de tipul antigenic), dar rezistentă la aciditatea gastrică și la acțiunea enzimelor proteolitice.

Izolarea bacilului botulinic în culturi pure se efectuează după metoda obișnuită de izolare și identificare a clostridiilor. Toxina poate fi depistată prin proba biologică pe șoareci albi. La o pereche se injectează intravenos sau intraperitoneal 0,7—1 ml de cultură sau extract din alimentul suspect. Altă pereche se injectează cu materialul de examinat în amestec cu serul polivalent. Observarea durează până la 4 zile. Dacă prima pereche de șoareci moare, atunci se efectuează proba pe 5 perechi de șoareci, utilizând seruri antitoxice monospecifice.

67.3. MICOTOXICOZELE

Micotoxicozele sunt otrăviri alimentare produse de substanțe toxice secretate de unele mucegaiuri multiplicat într-un aliment. Aceste substanțe se numesc micotoxine. Din alimente și din nutrețuri pentru animale au fost izolate mai mult de 200 specii de fungi și identificate câteva zeci de micotoxine. Aceste toxine pot fi depistate și în carne, lapte, ouă, unde se concentrează când animalele și păsările sunt alimentate cu nutrețuri în care s-au concentrat micotoxine.

Temperatura optimă pentru dezvoltarea fungilor este de 25—28°C.

Din grupul micotoxicozelor sunt cunoscute aflatoxicoza, fusariotoxicoza, ergotismul etc.

Aflatoxicoza este o intoxicație cauzată de toxine produse de mucegaiuri ca *Aspergillus flavus* (de aici și denumirea bolii), *Aspergillus parasiticus* și mai rar din genul *Penicillium*. Mai frecvent sunt afectate semințele oleaginoase cum sunt unele soiuri de nuci, semințe de bumbac, migdale, porumb ș. a. Perioada de după recoltare creează condiții optime de temperatură și umiditate pentru dezvoltarea fungilor și concentrarea aflatoxinei.

Se deosebesc mai multe tipuri de aflatoxine: B1, B2, C1, C2, M1, M2, B2a, C2a. Mai toxică este toxina B1. Toate aflatoxinele au o puternică acțiune hepatotoxică și hepatocarcinogenă.

Diagnosticul se bazează pe depistarea și identificarea mucegaiurilor. Depistarea

aflatoxinei se face prin inoculare în ouă embrionate de găină. Determină moartea embrionului.

Fusariotoxicoza se declanșează după consumul pâinii și produselor de panificație pregătite din grâu afectat de ciuperca *Fusarium graminearum*. Mai frecvent este afectată secara, mai rar grâul și orzul. Boala evoluează cu diaree și semne de afectare a sistemului nervos central.

Ergotismul apare când se utilizează în alimentație făină pregătită din grăunțe afectate de *Claviceps purpurea* (secară cornută). Toxina determină gastroenterită și afectarea sistemului nervos central (convulsii ș. a.).

67.4. EXAMENUL MICROBIOLOGIC COMPLEX ÎN CAZUL OTRĂVIRILOR ALIMENTARE

67.4.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor

Se recoltează probe în borcane sterile cu dopuri șlefuite. Carnea în cantitate de 500 g trebuie recoltată din diferite părți, inclusiv ganglioni limfatici, oase tubulare, sânge din cord, bilă, conținut intestinal. Cadavrele de păsări se recoltează întregi; peștele mărunt câte 2—3 bucăți, iar de la peștele mai mare se taie segmente din partea caudală și din vecinătatea capului. Din produsele lichide și semilichide, după omogenizare, se recoltează volume de 200 g (ml); din preparatele pentru felul II se recoltează 1—2 porții. Voma și lichidul de spălătură gastrică, în volum de 50—100 ml, se recoltează până la administrarea medicației. Se mai recoltează 5—10 g de fecale și 10 ml sânge din vena cubitală.

Materialul recoltat se sigilează și se expediază imediat la laborator. Conservarea probelor la 4—6°C nu trebuie să depășească 24 ore.

Pregătirea probelor. Se fărâmițează 25—30 g de produs într-un mojar steril cu o cantitate mică de apă peptonată 0,1%. Produsele lichide se însămânțează fără prelucrare prealabilă. Alimentele cu reacție acidă și lichidul de spălătură gastrică se neutralizează până la pH 7,2—7,4 cu soluție 10% bicarbonat de sodiu.

Crema, untul și înghețata se topesc la 43—45°C. Materiile fecale se amestecă cu soluție salină izotonă în proporție de 1:10.

67.4.2. Criteriile semnificației etiologice

Diagnosticul otrăvirilor alimentare se bazează pe anumite criterii:

1. O contaminare masivă cu bacterii a alimentului ($\geq 10^5$ raportată la 1 g de produs) cu izolarea repetată a aceluiași agent de la bolnav.
2. Identitatea markerilor epidemiologici (biovar, serovar, fagovar, antibiograma) la tulpinile izolate de la bolnavi și din alimentul suspect.
3. Creșterea semnificativă a titrului de anticorpi în serul bolnavilor față de tulpina microbiană suspectată (autoserodiagnostic).
4. Depistarea exotoxinei prin proba biologică sau prin RHA1.
5. Confruntarea datelor de laborator cu cele epidemiologice și evoluția bolii.

67.4.3. Analiza produselor alimentare

Din materialul examinat se pregătesc diluții decimale succesive de la 10^{-1} până la 10^{-8} .

Produsul nediluat se însămânțează în medii de îmbogățire (mediul «M», Müller-Kauffmann) și, paralel, pe plăci cu mediile Endo, Levine, Ploskirev, Wilson-Blair. Toate mediile însămânțate se incubează 24 ore la 37°C . Izolarea în cultura pură și identificarea se efectuează după schemele uzuale pentru familia *Enterobacteriaceae*.

Depistarea germenilor din genul *Proteus* se face însămânțând câte 0,1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-6} în apa de condensare a pantei de geloză după metoda Schukevici.

Escherichia coli se pune în evidență însămânțând câte 1 ml din aceleași diluții în eprubete cu câte 5 ml mediu Kessler. După 24 ore de incubare la 37°C , se repică din fiecare eprubetă câte 0,1 ml pe mediul Endo.

S. aureus se depistează prin însămânțarea a câte 1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-8} în eprubete cu 10 ml bulion peptonat cu 6,5% și 10% clorură de sodiu. Câte 0,1 ml din aceleași diluții se însămânțează pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou.

E. faecalis se evidențiază însămânțând câte 0,1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-7} în mediul Slanetz-Bartley.

C. perfringens se depistează prin pipetarea în cutii Petri sterile a câte 0,1 ml din toate diluțiile, peste care se toarnă imediat și se omogenizează câte 8—9 ml mediu Wilson-Blair. După solidificare se toarnă al doilea strat din 5—7 ml geloză «flămândă» (fără peptonă). Culturile obținute se identifică după schema uzuală.

67.4.4. Analiza materialului de la bolnav

La început se însămânțează direct probele pe plăci cu mediile Endo, Levine, Ploskirev, Wilson-Blair, geloză hiperclorurată cu lapte și ou.

Pentru depistarea salmonelilor pot fi utile hemoculturi cu însămânțarea a 10 ml sânge în 100 ml bulion biliat sau mediul Rappoport; bila se însămânțează în proporție de 1:10 în bulion peptonat; materiile fecale, voma, lichidul de spălătură gastrică, urina se însămânțează în medii de îmbogățire (mediul «M», Müller-Kauffmann).

Utilizând medii de cultură selective și metodele descrise în capitolele anterioare, putem izola și identifica *B. cereus*, *E. faecalis* sau *C. perfringens*.