



# CHARAKTERYSTYKA BAKTERII NALEŻĄCYCH DO GRUPY BACILLUS CEREUS IZOLOWANYCH W RAMACH MONITORINGU ŻYWNOSCI W POLSCE

Joanna Kowalska, Elżbieta Maćkiw, Jacek Postupolski

Pracownia Mikrobiologii Żywności, Zakład Bezpieczeństwa Żywności, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Bakterie z grupy *Bacillus cereus* (lub *Bacillus cereus* sensu lato) są tlenowymi lub fakultatywnie beztlenowymi Gram-dodatnimi laseczkami. Grupa *B. cereus* obejmuje, co najmniej dziewięć gatunków: *Bacillus cereus* sensu stricto, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus widmanni* oraz *Bacillus cytotoxicus*. Ze względu na powszechność występowania w środowisku oraz zdolność do tworzenia form przetrwalnych *B. cereus* stanowi istotne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Bakterie z grupy *B. cereus* izolowane są głównie z ryżu, makaronów, mięsa, warzyw, produktów mlecznych, przypraw oraz żywności gotowej do spożycia. *B. cereus* należy do bakterii wywołujących zatrucia pokarmowe o charakterze biegunkowym oraz wymiotnym. Ze względu na powszechność występowania w środowisku oraz zdolności do tworzenia form przetrwalnych zwanych sporamii *B. cereus* stanowi zagrożenie dla bezpieczeństwa produktów spożywczych. W Polsce od 2007 roku prowadzony jest monitoring żywności w kierunku oznaczania liczby przypuszczalnych *B. cereus*.

## STRESZCZENIE

Celem prowadzonych badań była fenotypowa i molekularna analiza bakterii z grupy *B. cereus* z uwzględnieniem profilu wytwarzanych toksyn oraz oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. Szczepy *B. cereus* izolowano z ciast zawierających krem poddany obróbce cieplnej lub niepoddanej obróbce cieplnej (240), produktów delikatesowych (24), warzyw (2), przypraw (1).

## METODOLOGIA

### Selekcja i reidentyfikacja izolatów

W ramach prowadzonych badań analizie poddanych zostało 267 izolatów bakterii przypuszczalnie należących do grupy *B. cereus*. Szczepy zostały wyizolowane przez Stacje Sanitarно-Epidemiologiczne z próbek żywności w ramach monitoringu żywności w Polsce bądź ognisk zatrucia pokarmowych zgodnie z normą PN-EN ISO 7932:2005. Wszystkie szczepy reidentyfikowano zgodnie z normą PN-EN ISO 7932:2005.

### Izolacja DNA

Genomowe DNA izolowano z zastosowaniem 20% Chelex® 100 Resin (Bio-rad). Analizowany szczep bakteryjny zawieszano w 80 µl wody wolnej od nukleaz (Eurx) oraz 20 µl 20% roztworu chelexu. Zawiesinę inkubowano w 99°C przez 15 min, następnie chłodzono przez 2 minuty na lodzie. Materiał wirowano w temperaturze pokojowej (13,4 rpm) przez 2-3 min. Odzyskiwano 80 µl supernatantu do dalszych analiz molekularnych.

### Określenie przynależności bakterii do grupy *B. cereus* za pomocą reakcji amplifikacji 16S rDNA

Amplifikację 16S rDNA wykonano z zastosowaniem zmodyfikowanej procedury przedstawionej przez Hansen i wsp. (2001) z zastosowaniem starterów 5' - TCG AAA TTG AAA GGC GGC - 3' 5' - GGT GCC AGC TTA TTC AAC - 3' (Genomed) oraz następujących warunków: 95°C - 10 min, 30x (94°C - 15 s, 63°C - 45 s, 72°C - 2 min), 72°C - 2 min. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie przez 60 min w 1,5% żelu agarozowym z zastosowaniem GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder jako wzorca mas (ThermoFisher).

### Określenie profilu toksyn za pomocą reakcji multiplex PCR

Amplifikację fragmentów genów *nhe*, *hbl*, *cytK* i *ces* wykonano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Ehling-Schultz i wsp. (2006) z modyfikacjami. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie przez 60 min w 1,5% żelu agarozowym z zastosowaniem GeneRuler™ 100 bp oraz 1kb DNA Ladder jako wzorców mas (ThermoFisher).

### Określenie lekooporności na wybrane antybiotyki oraz chemioterapeutyki

Do badań wykorzystano metodę dyfuzyjną z zastosowaniem krążków bibulowych nanoszonych na podłoże agarowe Mueller-Hintona (MH). Przygotowano zawiesinę badanego szczepu w skali 0,5 McF. Za pomocą sterylnej wymazówki badaną zawiesinę naniesiono na podłoże agarowe MH. Po naniesieniu krążków inkubowano w 37°C przez 18-20h. Testowano oporność na następujące antybiotyki i chemioterapeutyki (Oxoid): penicylinę G (10U, P10), ampicylinę (10 µg, AMP10), cefalotynę (30 µg, KF30), imipenem (10 µg, IMP10), gentamycynę (10 µg, CN10), chloramfenikol (30 µg, C30), erytromycynę (15 µg, E15), tetracyklinę (30 µg, TE30), ciprofloksacynę (5 µg, CIP5), klindamycynę (2 µg, DA2), trimetoprim/sulfametoksazol 1:19 (25 µg, STX25), rifampicynę (5 µg, RD5), ceftriakson (30 µg, CRO30), teikoplanin (30 µg, TEC30), amoksycylinę-kwas klawulanowy (30 µg, AMC30), chinuprystynę/dalfoprystynę (15 µg, QD15). Interpretację wyników wykonano w oparciu o kryteria CLSI.

## WNIOSKI

Przebadano łącznie 267 szczepów bakterii należących do grupy *B. cereus*. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na ocenę zdolności badanych bakterii grupy *B. cereus* do wytwarzania toksyn: hemolizyny, niehemolizyjnej enterotoksyny, cytotoksyny K, cereulidyny najczęściej wywołujących zatrucia pokarmowe ludzi. Dokonano oceny wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki. Wśród izolatów pobranych w ramach monitoringu żywności w Polsce znajdują się szczepy zdolne do wytwarzania toksyn. Ponadto wykazano występowanie lekooporności wśród szczepów *B. cereus* sensu lato wyizolowanych z żywności. Dalsze prowadzenie monitoringu żywności w kierunku oznaczania liczby *B. cereus* w żywności jest niezbędne do zapewnienia odpowiedniego nadzoru nad bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności z uwagi na potencjalne ryzyko dla zdrowia publicznego.

Praca naukowa finansowana z środków budżetowych na naukę w latach 2018-2019:  
1/ZŚ.1/2018, BŻ-5/2019

## DANE I WYNIKI

### Reidentyfikacja izolatów

Przeprowadzona reidentyfikacja izolatów, zgodnie z normą PN-EN ISO 7932:2005 potwierdziła, że wszystkie z analizowanych testów wykazywały charakterystyczny wzrost na podłożu MYP (kolonie różowe, matowe z halo. Wśród analizowanych szczepów zdolność do hemolizy potwierdzono w przypadku 242 z 267 analizowanych szczepów *B. cereus*.

### Określenie przynależności bakterii do grupy *B. cereus* za pomocą reakcji amplifikacji 16S rDNA

Przynależność do grupy *B. cereus* za pomocą reakcji amplifikacji 16S rDNA potwierdzono dla wszystkich analizowanych szczepów.

### Określenie profilu toksyn za pomocą reakcji multiplex PCR

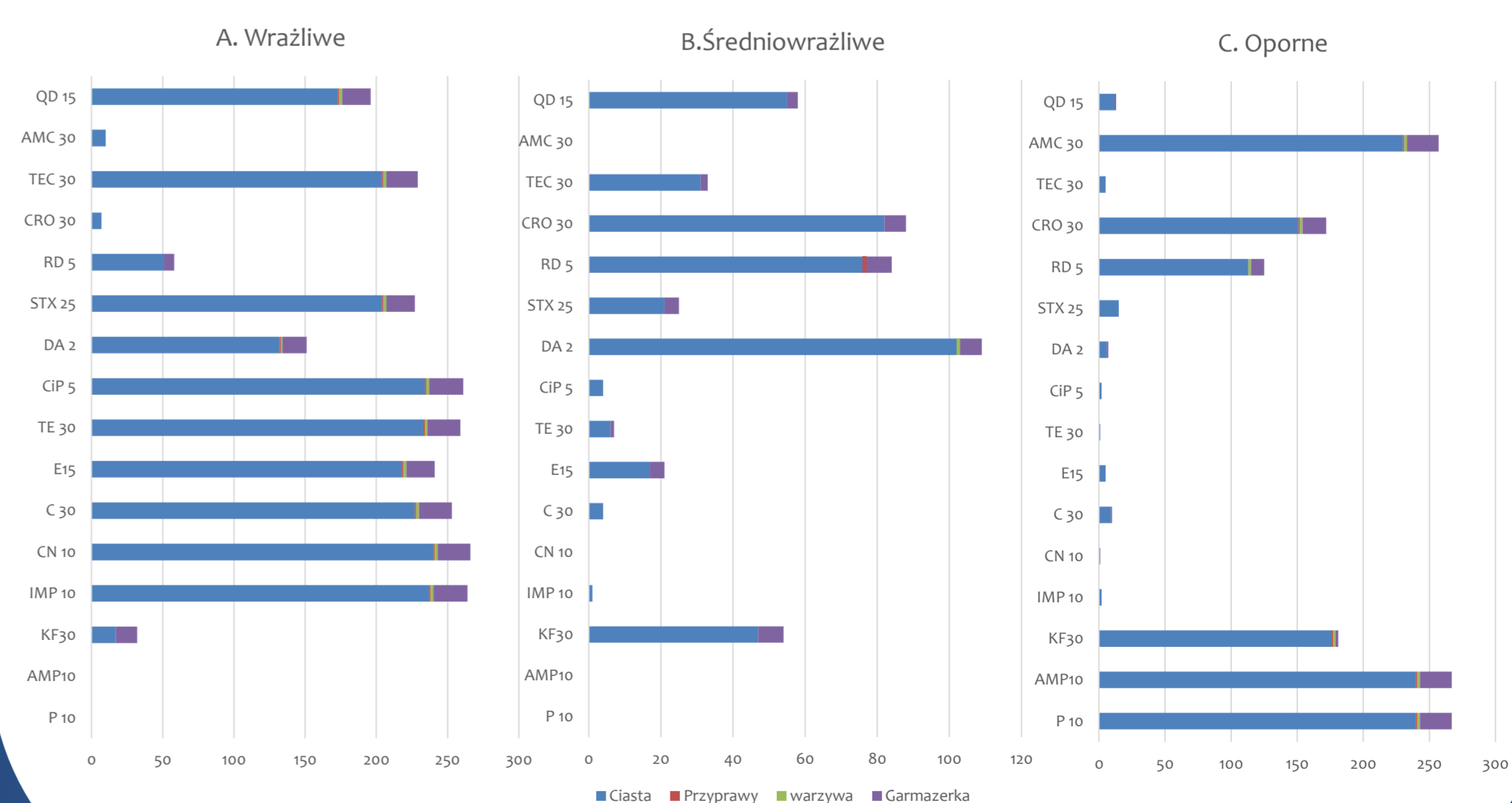
Szczepy wytwarzające toksyny kwalifikowano zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Ehling-Schulz. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Wśród badanych szczepów stwierdzono występowanie następujących genów: *hbl* (53,56 % analizowanych szczepów), *nhe* (91,93%), *cytK* (44,19%) *ces* (2,62%) oraz profili A (31,09%), B (0,37%), C (19,85%), D (8,99%), E (2,25%), F (28,84%), G (1,5%). U 2,62 % analizowanych izolatów nie został określony profil toksyn zgodny z ww. klasyfikacją. W przypadku 4,49% analizowanych szczepów nie stwierdzono występowania genów *hbl*, *nhe*, *cytK*, *ces*.

Profil	<i>hbl</i>	<i>nhe</i>	<i>cytK</i>	<i>ces</i>	Liczba izolatów		
					Ciasta z kremem niepoddany lub poddany obróbce termicznej (240)	Produkty delikatesowe (24)	Warzywa (2)
A					74	8	1
B					1		
C					45	8	
D					24		
E					5	1	
F					70	7	
G					4		
Niesklasyfikowany					1		
Nie stwierdzono					4	2	
					12		

Tab.1. Profile toksyn bakterii należących do grupy *B. cereus* wyizolowanych z żywności

### Określenie lekooporności na wybrane antybiotyki oraz chemioterapeutyki

Wyniki oceny wrażliwości szczepów na poszczególne antybiotyki zostały przedstawione na rycinie 1. Przeprowadzone badania wykazały oporność na penicylinę, ampicylinę u wszystkich analizowanych szczepów. Ponadto badane izolaty wykazały oporność na: amoksycylinę/kwas klawulanowy (96,25%), cefalotynę (67,79%), ceftriakson (64,42%), rifampicynę (46,82%), trimetoprim/sulfametoksazol (5,62%), chinuprystynę/dalfoprystynę (4,87%), chloramfenikol (3,75%), klindamycynę (2,62%), teikoplanin (1,87%), erytromycynę (1,87%), ciprofloksacynę (0,75%), imipenem (0,75%), tetracyklinę (0,37%), gentamycynę (0,37%).



Ryc.1. Oznaczenie lekooporności szczepów *B. cereus* A. szczepy wrażliwe, B. szczepy średniowrażliwe, C. szczepy odporne.

## BIBLIOGRAFIA

- Ehling-Schulz, M., Guinebreiere, M. H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., & Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 260(2), 232-240.
- Hansen, B. M., Leser, T. D., & Hendriksen, N. B. (2001). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 209-213.
- PN-EN ISO 7932. 2005. „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby przypuszczalnych *Bacillus cereus*. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 30 stopni C°” Polski Komitet Normalizacyjny.

## Kontakt:

Joanna Kowalska  
email: jkowalska@pzh.gov.pl