

Bacillus cereus

Bacillus cereus je grampozitivní neopouzdrěná pohyblivá sporotvorná tyčinka. Je to fakultativní anaerob s poměrně velkými vegetativními buňkami (1 x 3 až 5). Patří mezi saprofytické bakterie. Roste v teplotním rozmezí 8 – 55°C, optimálně při 28 – 35°C a není zaznamenána žádná tolerance pro vodní aktivitu (min. ~ 95) nebo pH. Rozpětí hodnot pH umožňující ještě růst je přibližně 4,9 – 9,3.

Spory jsou centrální, elipsoidního tvaru a nezpůsobují zduření sporangia. Jako sporotvorný mikroorganismus je *B. cereus* široce rozšířený v okolním prostředí. Převážně se vyskytuje v půdě, ve vodě a na rostlinách. Z této „všudypřítomnosti“ plyne skutečnost, že je běžnou součástí střevní mikroflory člověka. Spory vykazují různou teplotní odolnost. D hodnoty se pohybují při 95°C ve fosfátovém pufru od 1 do 36 minut (resistence se mění se serotypem). Jiné zdroje uvádějí D hodnotu při 100°C 5 minut.

B. cereus je kultivačně nenáročný. Roste na běžných médiích, na krevním agaru vyrůstá ve velkých, drsných koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou β-hemolýzy.

B. cereus je producentem řady toxinů a enzymů. První skupinu tvoří fosfolipázy C, které štěpí fosfatidylcholin, fosfatidylinositol a sfingomyelin. Dále jsou to dva hemolysiny. Hemolysin I (Cereolysin) je oxygenlabilní a je letální pro myš. Hemolysin II je oxygenstabilní. Průjmový toxin vedle svojí enterotoxické aktivity zvyšuje permeabilitu cév, je nekrotizující a letální pro myš. Druhým toxinem je emetický toxin, který je vysoce termostabilní, odolný vůči pH a proteázám.

Může způsobovat onemocnění z potravin. Onemocnění vzniká po požití kontaminovaných potravin enterotoxinogenním kmenem a z kontaminovaných kosmetických přípravků, či očních kapek.

Vyskytuje se ve dvou klinických formách:

1. Průjmová forma nastává po inkubaci 8 – 24, spojuje se s konzumací masových pokrmů a omáček a je podobná otravě, kterou vyvolal *Clostridium perfringens*.
2. Emetická začíná 1 – 6 hodin po požití kontaminované potravy a je dávana do souvislosti s požitím rýžových pokrmů a těstovin. Podobnost s otravou, kterou způsobil *Staphylococcus aureus*.

Tvorba toxinů byla zjištěna i u některých kmenů *Bacillus subtilis*. *Bacillus anthraci* je původcem onemocnění lidí a zvířat, jež je nazýváno snětí slezinnou.

K otravám dochází při pomnožení *B. cereus* v potravině na koncentraci buněk 10^7 g^{-1} potraviny (u dětí stačí koncentrace 10^5 g^{-1}). Povolený výskyt této bakterie je legislativně upraven § 19 písm. b) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, vyhláškou o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení č. 294/1997 Sb. Vyhláška udává tento povolený výskyt:

Mikroorganismus	Kategorie potravin	Nejvyšší mezní hodnota
Bacillus cereus	potraviny neurčené k přímé spotřebě	10 ⁵ /g
	potraviny určené k přímé spotřebě	10 ⁴ /g
	potraviny určené pro kojeneckou a dětskou výživu	10 ² /g

Tato vyhláška také upravuje hodnoty tolerované při stanovování u některých vybraných potravin.

Ojedinele může způsobovat onemocnění u hostitele s výrazně sníženou imunitou, tak může vyvolat meningitis, endokarditis, endophtalmitis, konjunktivitis nebo akutní gastroenteritis. Je též původcem oportunitních infekcí.

PRŮJMOVÝ A EMETICKÝ TOXIN

Jak průjmový, tak i emetický toxin jsou enterotoxiny. Toxin průjmového onemocnění je tepelně nestabilní protein s molekulovou hmotností 38000 – 46000. Je citlivý na proteolytické enzymy jako jsou trypsin a pepsin a je produkován během pozdní exponenční fáze růstu. Zbývá objasnit, zda v případě otrav je toxin produkován v potravíně nebo trávicí soustavě.

Molekulová hmotnost emetického toxinu je menší než 10000. Je tepelně odolný (stabilní při 126°C po 90 minut) a je odolný k proteolytickým enzymům a nízkému pH. Produkce toxinu probíhá v potravíně od pozdní exponenční do stacionární fáze růstu a může být spojena se sporulací.

Jednotlivé vlastnosti obou toxinů shrnuje následující tabulka.

Vlastnost	Průjmový toxin	Emetický toxin
<i>Molekulová hmotnost</i>	38000 - 46000 (protein)	< 10000 (peptid)
<i>Isoelektrický bod</i>	4,9 - 5,6	-
<i>Stabilita</i> teplotní	tepelně stabilní 45°C, 30 min. nestabilní 56°C, 5 min.	stabilní 126°C, 90 min.
pH	nejstabilnější při pH 4 - 11	stabilní při pH 2 - 11
proteasy	citlivý na pronasu, trypsin a pepsin	citlivý na trypsin a pepsin
<i>Produkce</i> V potravíně	předvytvořen (?)	předvytvořen
Optimální teplota	32 - 37°C	25 - 30°C
Růstová fáze	pozdní exponenční	pozdní exponenční- stacionární (spojení se sporulací ?)
<i>Biologická aktivita</i> myši	letální	?
opice	průjem do 1 - 3 hod.	zvracení do 1 - 5 hod.

VÝSKYT-SPOJENÍ S POTRAVINAMI

Schopnost tvořit spory resistantní k činitelům jako jsou sušení a teplo vede k tomu, že onemocnění způsobující bacili jsou široce rozšířeni v potravinách. Ve většině případů však jsou pouze malou částí mikroflory a nejsou přítomni v počtu dostatečném k vyvolání onemocnění.

Vysoký výskyt *B.cereus* je znám v pasterovaném a jinak tepelně ošetřeném mléce (typické je 35 – 48% pozitivních vzorků) ve srovnání s mlékem neošetřeným (~ 9% pozitivních). V tomto případě tepelné zpracování spíše napomůže sporotvorným mikroorganismům. Ve většině případů byly detekované počty nízké ($< 10^3 \text{ ml}^{-1}$), ale jestliže je pasterizované mléko nebo smetana skladována při nedostatečně nízké teplotě, *B. cereus* může růst a způsobovat kažení známé jako „sladké srážení“ nebo „hořknutí smetany“. Přesto jsou mléko a mléčné výrobky zřídka spojovány s onemocněním způsobeným *B. cereus*, ačkoli sušené mléko mělo za následek propuknutí nákazy, když se použilo na výrobu některých potravin, jako např. některých druhů cukrovinek.

Rezistence spor k vysoušení jim dovoluje přežít na suchých potravinách jako jsou obiloviny a mouka. Propuknutí otrav v Norsku (popsáno v úvodu) měla za následek kukuřičná mouka, která byla použita k zahuštění vanilkové omáčky. Normální zahřátí během přípravy neinaktivovalo spory a následné dlouhodobé skladování omáčky při vysoké aktivitě vody a pokojové teplotě přispělo ke klíčení spor a nárůstu mikroorganismu.

Nejčastější příčinou otrav emetickým toxinem jsou potraviny obsahující škrob, jako je rýže a těstoviny. V Anglii je onemocnění nazýváno „syndrom čínské restaurace“. Velké množství rýže uvařené na několik dní dopředu je ideálním prostředím k pomnožení *B. cereus*. Spory, běžněji ty tepelně odolnějšího serotypu 1, přežívají předvaření. Pak následuje jejich klíčení, růst a produkce emetického toxinu v potravinech během skladování. Tomu se dá předejít snížením teploty rýže pod 8°C , ale úroveň chlazení uvnitř uvařeného množství rýže, dokonce i když je přemístěna do chladírny, může být příliš malá pro zastavení růstu a produkce toxinu. Opětne zahřátí rýže před podáním neinaktivuje emetický toxin a nepřispěje k bezpečnosti.

Průjmový syndrom může mít za následek větší škála potravin, včetně masových výrobků (např. játrová paštika), polévek, zeleniny, pudingu a omáček. Sušené byliny a koření, které se používají při přípravě pokrmů, mohou být významným zdrojem *B. cereus*, což bývá relativně častým důvodem vysokého výskytu tohoto onemocnění v Maďarsku. V letech 1960 – 1968 to zde byla třetí nejběžnější příčina onemocnění z potravin, která postihla 15,2% lidí. Čerstvější údaje naznačují, že se jeho význam poněkud snižuje, ale zda je to změnami v kulinárních úpravách, zlepšením hygieny, poklesem kontaminace koření nebo nedostatečností statických údajů, není známo.

ISOLACE A STANOVENÍ

Při identifikaci nejsou nutné nahromadovací techniky, protože napadená potravina obsahuje *B. cereus* ve větším množství ($>10^5 \text{ g}^{-1}$). To stejné platí pro vzorky fekálií nebo zvratků a používá se tedy neselektivní medium jako například krevní agar (v některých případech se přidává polymyxin, které má funkci selektivního činidla k potlačení gramnegativity). *B. cereus* může být detekován po 24 hodinách inkubace při 37°C díky jeho charakteristické morfologii kolonií.

Typická je jejich velikost (průměr 3 – 7 mm), jsou ploché nebo nepatrně zvýšené, šedozelené charakteristicky zrnité nebo púdně-skleněné. V okolí kolonií se vytváří zóna α nebo β hemolýzy.

Chceme-li potvrdit, že jsme na krevním agaru skutečně izolovali *B. cereus*, nebo je naším cílem izolovat malá množství tohoto mikroorganismu v potravinách, musíme použít více selektivně-diagnostický agar. Tyto púdy využívají tři základních vlastností *B. cereus*: resistance k antibiotiku polymyxin, neschopnost zkvašovat mannitol, produkce lecithinasy (fosfolipasy). Jedním z nejvíce používaných je médium PEMBA (polymyxin / pyruvát / vaječný žloutek / mannitol / bromthymolová modř agar). Polymyxin, který je zde obsažen, potlačí růst jiných bakterií. Pokud by se stala problémem přítomnost kvasinek nebo plísni, může agar obsahovat také actidion. Na médiu PEMBA vytváří *B. cereus* typické vroubkované kolonie, které zadržují tyrkysovou modř pH indikátoru (bromthymolová modř) z důvodu neschopnosti zkvašovat mannitol. Kolonie jsou obklopeny zónou žloutkovaječného srážení, které způsobila lecithinasa aktivita. Přítomnost pyruvátu v médiu zlepšuje reakci srážení vaječného žloutku a nízká úroveň peptonu zvýší sporulaci. Mezi další běžně používaná média patří MYA (mannitol / vaječný žloutek agar) a MYP (mannitol / vaječný žloutek / polymyxin agar).

Časově méně náročným postupem sloužícím k potvrzení přítomnosti *B. cereus* je metoda mikroskopická, která využívá barvení spor a intracelulárních lipidů. Spory se zbarví zeleně, globule lipidů černě a zbytek buňky (cytoplazma) červeně. Biochemické potvrzení je založeno na schopnosti produkovat kyselinu z glukózy, ale ne již z mannitolu, xylosy a arabinózy.

Průjmový toxin může být detekován komerčně dostupným latexovým aglutinačním kitem. Přesto detekce toxinu a stanovování serotypu není obvyklou součástí rutinního potravinářského dozoru.