

# Bacillus cereus przyczyną zatrucia pokarmowego u szynszyli

DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ, ANTONI J. FUROWICZ, ANNA PERUŻYŃSKA

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-460 Szczecin

## Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A. J., Perużyńska A. Bacillus cereus causes of food intoxication in chinchillas

### Summary

The purpose of this investigation was to state the cause of death in chinchillas with clinical symptoms of strong watery diarrhoea.

Investigations were carried out on 10 standard-race chinchillas, and on fodder manufactured for chinchillas as well as its 12 components.

*B. cereus* strains which cause enterotoxin diarrhoea were isolated - on a PEMBA medium - from all the altered parts of the large and small intestine as well as from the gastric and intestine contents. Biochemically identical strains in fodder ( $5.4 \times 10^5$  c.f.u./g), premix ( $1.8 \times 10^7$  c.f.u./g), wheat ( $1.4 \times 10^1$  c.f.u./g), barley ( $1.4 \times 10^1$  c.f.u./g) and oat ( $1.1 \times 10^1$  c.f.u./g) were found.

The strains isolated from both the animals and fodder produced enterotoxin in BCET-RPLA tests. It was noted that strains isolated from fodder and its 4 components survived in a strong acid environment (pH 4.0-1.5). In disc diffusion testing both strains were sensitive to amikacin, ciprofloxacin, enterofloxacin, imipenem and norfloxacin.

**Keywords:** *Bac. cereus*, intoxication, chinchilla.

*Bacillus cereus* jest Gram dodatnią, względnie bez-tlenową, laseczką wytwarzającą endospory. Bakteria ta jest szeroko rozpowszechniona w środowisku, dlatego często izoluje się ją z gleby, wody i powietrza. Następstwem powszechności występowania tego drobnoustroju jest możliwość zanieczyszczenia (kontaminacji) żywności człowieka i paszy dla zwierząt. *B. cereus* jest często izolowany ze zbóż (zwłaszcza ryżu) i potraw mącznych oraz z mleka (surowego i pasteryzowanego) i jego przetworów, a także ze świeżego mięsa (1, 8). Bardzo często dochodzi do zakażenia produktów na skutek dodatku do nich przypraw zanieczyszczonych ciepłoopornymi przetrwalnikami *Bacillus cereus* (9). Podczas często stosowanych zabiegów termicznych, związanych z przygotowaniem w niezbyt wysokich temperaturach, zarówno żywności (zwłaszcza potraw przygotowanych na bazie ryżu), jak i paszy dla zwierząt, przetrwalniki *B. cereus* kiełkują, a wytworzone komórki wegetatywne syntetyzują toksynę: wymiotną i (lub) biegunkową. U człowieka toksyna wymiotna jest związana etiologicznie z syndromem wymiotnym zatrucia, o charakterze typowej intoksykacji pokarmowej (1, 10). Jest ona ciepłostalym białkiem o niskiej masie cząsteczkowej, które jest wyjątkowo efektywnie syntetyzowane w procesie tworzenia endospor. Z kolei enterotoksyna biegunkowa

odpowiedzialna za syndrom biegunkowy (często o charakterze bakteryjnej infekcji pokarmowej), jest białkiem o m.c. około 50 000. Zatrucie tą toksyną przypomina zatrucie *Cl. perfringens*, bądź *Vibrio cholerae*. Drobnoustroj ten wytwarza ponadto szereg innych toksyn (m.in. cerelizynę o silnych właściwościach nekrotycznych, hemolizynę II oraz lecytynazę o charakterze metaloenzymów), nie związanych jednak z zakażeniami pokarmowymi (1, 9).

W celu udowodnienia, że drobnoustroj jest czynnikiem etiologicznym zatrucia należy ustalić czy szczep wyizolowany z żywności jest tym samym, który izoluje się od chorego zwierzęcia. Samo wyosobnienie *B. cereus* z paszy nie wystarcza, albowiem drobnoustroj ten bardzo często występuje w środowisku, nie powodując żadnych objawów klinicznych choroby. O ile dojdzie do izolacji *B. cereus* z wymiocin, kału bądź narządów wewnętrznych należy pamiętać, że zasadniczym elementem jest wówczas określenie liczby komórek, typu serologicznego lub fagowego oraz wirulencji wyizolowanych szczepów, przede wszystkim ich zdolności do wytwarzania toksyn (9). Z reguły zatrucia pokarmowe na tle *B. cereus* odnotowuje się u ludzi. U gryzoni roślinożernych, nie udowodniono zatruć pokarmowych enterotoksyną wytwarzaną przez *Bacillus cereus*.

Celem badań było określenie przyczyn zejść śmiertelnych szynszyli z objawami silnej biegunki, karmionych paszą, z której wyizolowano *Bacillus cereus*.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 10 padłych, z klinicznymi objawami silnej biegunki, szynszyli rasy standard oraz pasza i 12 jej składników, którą były karmione zwierzęta.

Sekcyjnie u wszystkich padłych zwierząt stwierdzono silne przekrwienie śluzówki zarówno jelita cienkiego jak i grubego. Do badań mikrobiologicznych pobrano wycinki od wszystkich 10 szynszyli, ze zmienionych fragmentów jelit. Ponieważ szynszyle są zwierzętami, u których odruch wymiotny występuje bardzo rzadko, nie można było pobrać do analizy wymiocin (istotny materiał w zakażeniach pokarmowych człowieka), a badaniem mikrobiologicznym objęto jedynie zawartość żołądka i jelit 10 padłych szynszyli. Pasza przeznaczona dla szynszyli składała się z: owsa, jęczmienia, soi, pszenicy, otrąb pszennych, siemienia lnianego, suszu z traw, metioniny, behladolu, premiksu, melaśy i mączki zwierzęcej. Wszystkie składniki były mieszane w temp. 50°C. Do badań mikrobiologicznych pobierano po 10 g paszy i każdego jej składnika, po czym wykonywano rozcieńczenia dziesiętne w wodzie peptonowej. Wszystkie próby (wycinki z jelit, treść z żołądków i jelit oraz paszę i jej składniki) wysiewano na agar wzbogacony z dodatkiem żółtka jaja kurzego, agar z 5% dodatkiem krwi baraniej oraz na podłoża McConkeya, Chapmana, Listeria Selective Agar Base, Edwardsa, Wilson-Blaira i PEMBA. Hodowle inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. Z kolonii wyrosłych na selektywnym podłożu PEMBA wykonywano preparaty mikroskopowe, które barwiono metodą Grama oraz metodą Holbrooka i Andersona, w której połączono wybarwienie przetrwalników wg Ashibiego z barwieniem wewnątrzkomórkowym lipidów wg Burdona. Jako barwników użyto zieleni malachitowej oraz roztworu czarnego sudanu i safraniny. Zasadnicze właściwości *B. cereus* zostały określone przede wszystkim w oparciu o obecność ciałek lipidowych oraz rodzaj wytworzonych endospor, syntezę lecytynazy, wzrost w warunkach beztlenowych, wzrost w temp. 50°C, produkcję kwasu z glukozy, mannitolu, ksylozy, redukcję azotanów, hydrolizę skrobi, żelatyny i tyrozyny. W celu wykrycia enterotoksyny biegunkowej *B. cereus* zastosowano test odwróconej biernej aglutynacji lateksowej firmy Oxoid: Bacillus cereus RPLA Toxin Detection Kit „BCET-RPLA TD 950”. Jest to czuła, półilościowa metoda, pozwalająca na wykrycie obecności białkowej enterotoksyny w żywności i w filtracie z hodowli bakterieryjnej (1). Do badania obecności enterotoksyny użyto 10 szczepów wyizolowanych z jelit padłych szynszyli oraz 5 szczepów wyizolowanych z paszy, premiksu, jęczmienia, owsa i pszenicy. Wyniki aglutynacji odczytywano zgodnie z wzorami zamieszczonymi przez producenta testu, uznając wynik (+), (++) , (+++) za pozytywny, a (-) i (+/-) za ujemny.

Sprawdzono ponadto przeżywalność wyizolowanych z premiksu, jęczmienia, pszenicy, owsa i całej paszy szczepów *B. cereus* w środowisku wybitnie kwaśnym (pH od 1,7 do 4,0). Wybrany zakres był podyktowany dwoma

aspektami: pH przy wpuście do żołądka gryzoni roślinożernych wynosi 1,5 (7), a przeżywalność w bardzo kwaśnym środowisku (pH = 4,3) jest cechą diagnostyczną, typową dla komórek *B. cereus* i odróżniającą je od *B. licheniformis* i *B. subtilis*, dla których najbardziej skrajny odczyn to pH = 5,0. 1 ml hodowli bulionowej szczepu *B. cereus* o gęstości 1,0 w skali Mc Farlanda wysiewano do 10 ml bulionu, poszczególne próby zakwaszono do pH: 4,0; 3,0; 2,0; 1,5. Hodowlę inkubowano (24 godz. w 37°C), po czym przesiewano na podłoże PEMBA. Charakter wzrostu na tym podłożu analizowano po 1 dobie.

Antybiotykowrażliwość szczepów *B. cereus* wyizolowanych z jelit i paszy, określono przy użyciu metody dyfuzyjno-kraźkowej.

### Wyniki i omówienie

Po 24-godzinnej inkubacji w temp. 37°C na podłożach, na których dokonano posiewu z jelit (cienkiego i grubego) oraz z ich zawartości i treści żołądków, oprócz pojedynczych kolonii *E. coli*, *P. vulgaris*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, stwierdzono w każdym przypadku, bardzo obfity wzrost dużych, o nieregularnym brzegu, płaskich kolonii, wytwarzających hemolizę  $\beta$  (agar z krwią) i wytwarzających lecytynazę (agar z żółtkiem), co manifestowało się obecnością białego precypitatu wokół wyrosłych kolonii. Na podłożu PEMBA stwierdzono obfity wzrost dużych, płaskich kolonii koloru „błękitu pawiego” z dużą, niebieską strefą precypitacji żółtka. PEMBA jest selektywnym podłożem, służącym do izolacji *B. cereus*, zawierającym agar z polimyksyną, pirogronianem, mannitolem i błękitem bromotymolowym. Inhibitorem hamującym wzrost flory zanieczyszczającej badany materiał jest polimyksyna (1).

Z kolei, analiza mikrobiologiczna paszy i jej składników wykazała obecność *B. cereus* w premiksie, w ilości  $1,8 \times 10^7$  j.t.k./g oraz w ilościach nie przekraczających 14 j.t.k./g w owsie, pszenicy i jęczmieniu. W paszy stwierdzono obecność  $5,4 \times 10^5$  komórek *B. cereus* w 1 g (tab. 1). Udział procentowy premiksu w paszy przeznaczonej dla szynszyli jest niewielki i wynosi 1%. W paszy stwierdzono ponadto obecność bakterii z grupy *coli* (tab. 1). W hodowli, w warunkach beztlenowych, na podłożu Wilson-Blaira nie stwierdzono obecności beztlenowców – *Cl. perfringens*, które również mogły być przyczyną syndromu biegunkowego, obserwowanego u szynszyli. Liczba wyizolowanych z paszy komórek bakterieryjnych stanowiła istotny dowód, że przyczyną zatrucia pokarmowego był *Bacillus cereus*. Według Kramera i wsp. (cyt. wg 9) o ile zostanie udowodnione, że w podejrzanym produkcie występuje znamienne, tj.  $> 10^5$  j.t.k./g liczba komórek *B. cereus*, bądź też stwierdzi się, że wyizolowany jednocześnie z kału i żywności szczep należy do tego samego serotypu, stanowi to przekonujący dowód, że jest on czynnikiem etiologicznym wywołującym zakażenia pokarmowe. Do wywołania dysfunkcji przewodu pokarmowego, z jednej strony potrzebna jest

Tab. 1. Analiza mikrobiologiczna paszy i jej składników (j.t.k.\*/g)

Pasza i składniki	Ogólna liczba komórek bakterii tlenowych	Liczba komórek bakterii z grupy <i>coli</i>	Liczba komórek <i>Bacillus cereus</i>
Pasza	$9,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^1$	$5,4 \times 10^5$
Owies	$3,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$
Jęczmień	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^1$
Soja	$7,9 \times 10^2$	0	0
Pszenica	$5,0 \times 10^3$	0	$1,4 \times 10^1$
Otręby pszenne	$2,9 \times 10^4$	0	0
Siemię lniane	$2,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	0
Susz z traw	0	0	0
Metionina	0	0	0
Mączka mięsna	$5,1 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	0
Behladol	$1,7 \times 10^2$	0	0
Premix	$8,2 \times 10^7$	0	$1,8 \times 10^7$
Melasa	$6,4 \times 10^3$	0	0

Objaśnienie: \* j.t.k. – jednostka tworząca kolonię

Tab. 2. Porównanie właściwości szczepów *B. cereus* wyizolowanych z paszy i jelit

Cecha	<i>Bacillus cereus</i> wyizolowany z	
	paszy (5 szczepów)	jelit (10 szczepów)
Obecność ciałek lipidowych	+	+
Rodzaj spor	1	1
Produkcja lecytynazy	+	+
Beztlenowy wzrost	+	+
Wzrost w temp 50°C	-	-
Rozkład mannitolu	-	-
Rozkład ksylozy	-	-
Kwas z glukozy	+	+
Redukcja azotanów	+	+
Hydroliza skrobi	+	+
VP	+	+
Katalaza	+	+
Ruch	+	+
Hydroliza żelatyny	+	+

znaczna liczba komórek *B. cereus*, o dużej wirulencji (synteza toksyn), z drugiej zaś obecność czynników predysponujących do zachorowania, takich jak np. obniżony poziom lokalnej odporności komórkowej lub humoralnej. Być może u badanych zwierząt takie zaburzenia zaistniały. Szynszyle należą do gatunku ssaków, u których wiele zakażeń bakteryjnych (infekcje *L. monocytogenes*, *Y. pseudotuberculosis*), powoduje zapalenie przewodu pokarmowego i uporczywą biegunkę (3, 4, 5, 6).

Założono, że mieszanie składników paszy w temperaturze 50°C powoduje niszczenie form wegetatywnych i jednocześnie stymuluje proces sporulacji szczepów *B. cereus*. Kiełkujące w temperaturze pokojowej (w trakcie przechowywania paszy) endospory produkują toksynę. Również przechowywanie paszy sprzyja namnażaniu się komórek bakteryjnych. Szczepy *B. cereus* rozwijają się w szerokim zakresie temperatur: 10-48°C, lecz optimum ich wzrostu wynosi 28-35°C (9). Rozwój komórek bakteryjnych

stymulowany jest również przez dodatek nietypowego, dla zwierząt roślinożernych, składnika paszy, a mianowicie mączki mięsnej. Według wielu autorów elementy te odgrywają poważną rolę w stymulacji wzrostu *B. cereus* (1, 9).

Warto podkreślić, iż pasza zakażona komórkami *B. cereus* miała niezmienione cechy organoleptyczne. W opisanych przypadkach zatruc pokarmowych u ludzi, na tle *B. cereus*, również nigdy nie obserwowano zmienionych właściwości organoleptycznych zakażonych produktów (9).

Wszystkie kolonie, izolowane od padłych zwierząt i z paszy, wyrosłe na podłożu PEMBA, barwiono metodą Holbrooka i Andersona. W zastosowanym barwieniu endospory *B. cereus* barwiły się na kolor zielony, cytoplazma komórki wegetatywnej na kolor czerwony, a ciałka lipidowe wewnątrz cytoplazmy na czarny. W barwieniu Grama stwierdzono obecność barwiących się pozytywnie laseczek. Pozostałe cechy bakterii również potwierdziły ich przynależność do gatunku *B. cereus* (tab. 2).

Identyczność cech morfologicznych i biochemicznych, drobnoustrojów wyizolowanych zarówno z paszy i 4 jej składników, jak i z jelit oraz treści żołądka i jelit, pozwala założyć, że wszystkie izolacje należą do tego samego biotypu, będącego przyczyną zatrucia pokarmowego, a konsekwencją którego było zejście śmiertelne szynszyli. Zasadniczym elementem w diagnostyce *B. cereus* jest określenie jego wirulencji, a przede wszystkim jego zdolności do wytwarzania tok-

syn. Odnotowano że, w teście Bacillus cereus RPLA Toxin Detection Kit, przeciwciała związane z cząsteczkami lateksu reagowały silnie z rozpuszczonym antygenem, którym była enterotoksyna *B. cereus*, drobnoustrojów wyizolowanych z paszy i jelit wszystkich padłych zwierząt. Efektem obecności enterotoksyny była dobrze widoczna, w każdym rozcieńczeniu, aglutynacja lateksowa. Identyczne wyniki otrzymano w przypadku enterotoksyny pochodzącej ze szczepów *B. cereus* wyizolowanych z paszy, premiksu, pszenicy, owsa i jęczmienia.

W badaniach określających wrażliwość na niskie stężenie jonów wodorowych stwierdzono przeżywalność (nawet przy pH 1,5), a tym samym niską wrażliwość, szczepu *B. cereus* wyizolowanego z paszy, premiksu, jęczmienia, owsa i pszenicy (tab. 3). Uzyskany wynik potwierdza ponadto, że szczepem wyizolowanym z paszy był *B. cereus* rozwijający się przy pH poniżej 4,0. Należy podkreślić, że pozostałe gatunki rodz. *Bacillus* nie przeżywają w tak skrajnie kwaśnym środowisku (9).

W wyniku analizy antybiotyko-wrażliwości stwierdzono pełną wrażliwość obu szczepów na amikacynę, ciprofloksacynę, enrofloksacynę, imipenem i norfloksacynę oraz oporność na: ampicylinę, amoksycylinę, apramycynę, bacitracynę, karbenicylinę, cefuroksim, cefradynę, cefazolin, kloksacylinę, kolistynę, doksy-cyklinę, erytromycynę, gentamycynę, linkomycynę, neomycynę, nitrofurantoinę, oleandomycynę, oksyte-tracyklinę, penicylinę, rifampicylinę, spektinomycynę, streptomycynę, sulfonamidy, tobramycynę, trimetoprim i wankomycynę. Zastosowanie antybiotykoterapii kierunkowej ma sens tylko w przypadku zatruc pokarmowych przebiegających w formie zakażeń bakteryjnych (najczęściej efekt oddziaływania enterotoksyny, wytwarzanej przez komórki *B. cereus* w przewodzie pokarmowym). Dotyczy to także ciężko przebiegających infekcji zwierząt i człowieka (bakteriemia, zapalenie płuc, zapalenie gałki ocznej, mastitis), wywoływanych przez cereolizynę *B. cereus* (1). Rodzaj antybiotykoterapii jest bardzo istotny, ze względu na fakt syntetyzowania przez komórki *B. cereus*  $\beta$ -laktamaz (w odróżnieniu od *B. anthracis*) (2). Z tego też względu są one odporne na penicylinę, ampicylinę oraz cefalosporyny. Ponadto, wykazują oporność na trimetoprim. Natomiast większa część szczepów jest wrażliwa na aminoglikozydy, erytromycynę, wankomycynę, klindamycynę oraz tetracykliny i sulfonamidy, które to chemioterapeutyki są zalecane w terapii schorzeń wywoływanych przez *B. cereus* oraz *B. cereus* var. *mycoides* (1, 9).

Badane szczepy wykazywały wrażliwość tylko na 5 antybiotyków. Przyczynę tego stanu można wiązać ze

Tab. 3. Wpływ odczynu podłoża na wzrost szczepów *Bacillus cereus*

pH bulionu/t	Liczba komórek <i>B. cereus</i> wyizolowanych z				
	paszy	premiksu	pszenicy	jęczmienia	owsa
4,0/24h	$7,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3$
3,0/24h	$3,7 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$
2,0/24h	$9,1 \times 10^1$	$5,1 \times 10^1$	$4,9 \times 10^1$	$2,9 \times 10^1$	$3,21 \times 10^1$
1,5/24h	$3,2 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$4,6 \times 10^1$	$4,4 \times 10^1$

Objaśnienie: t – czas inkubacji w temp. 37°C w godz.

wzrastającą opornością szczepów bakteryjnych, ze względu na dosyć powszechne zjawisko dodawania przez hodowców, do pasz przeznaczonych dla szynszyli, antybiotyków przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych. W przypadku, gdy dochodzi do zatrucia pokarmowego o charakterze typowej intoksykacji (efekt oddziaływania toksyny wymiotnej), antybiotykoterapia nie daje żadnych efektów. W badaniach własnych wykazano, że szczep *B. cereus*, powodujący zachorowania szynszyli syntetyzował enterotoksynę. Z reguły szczepy takie nie wytwarzają, lub syntetyzują wyjątkowo, toksynę wymiotną (9). Tak więc wolno założyć, iż zastosowanie antybiotyków, określonych *in vitro* jako skuteczne, może być przydatne w terapii tego rodzaju infekcji.

Reasumując całokształt badań należy stwierdzić, iż udowodniono rolę enterotoksycznego szczepu *B. cereus*, wyizolowanego z paszy, w wywoływaniu syndromu biegunkowego i zejść śmiertelnych szynszyli. W przypadku masowo występującej biegunki u szynszyli należy brać pod uwagę możliwość zakażenia enterotoksyną szczepu *Bacillus cereus*.

## Piśmiennictwo

1. Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A. J.: Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1999, s. 90.
2. Carman J. A., Hambleton P., Melling J.: Bacillus anthracis, w: Isolation and Identification of Micro-organisms of Medical and Veterinary Importance. Red. C. H. Collins, J. M. Grange, Academic Press, London 1985, s. 207.
3. Emirsajłow-Zalewska W., Furowicz A. J.: Medycyna Wet. 53, 51, 1997.
4. Furowicz A. J., Broda D., Łoczewski P., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 45, 289, 1989.
5. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D., Kowalczyńska M.: Medycyna Wet. 52, 116, 1996.
6. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D.: Magazyn Wet. 8, 130, 1999.
7. Gibaszewicz W.: Choroby królików PWN Warszawa 1989, s. 19.
8. Molska I.: Przem. Spoż. 53, 13, 1996.
9. Turnbull P., Kramer J., Melling J.: Bacillus, w: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Red. M. T. Parker, B. J. Duerden. Vol. 2, E. Arnold, A division of Hodder and Stoughton, London-Melbourne-Auckland 1990, s. 187.
10. Zaremba M. L., Borowski J.: Mikrobiologia lekarska. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1997, s. 727.

Adres autora: dr Danuta Czernomysy-Furowicz, ul. Monte Cassino 16A/2, 70-466 Szczecin