

Agnieszka Bednarczyk, Elżbieta Grażyna Daczowska-Kozon*

Katedra Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Akademia Rolnicza
ul. P. Pawła V/3; 71-459 Szczecin; e-mail: kozon@tz.ar.szczecin.pl

Wpłynęło w listopadzie 2007 r.

1. Wstęp. 1.1. Charakterystyka grupy *Bacillus cereus*. 2. Chorobotwórczość *B. cereus*. 2.1. Inwazyjność *B. cereus*. 2.2. Toksyny *B. cereus* i mechanizm wywoływania objawów chorobowych. 2.2.1. Enterotoksyny. 2.2.2. Toksyna emetyczna. 2.2.3. Toksyny innych przedstawicieli grupy *B. cereus*. 2.2.4. Enzymy o charakterze toksyn. 2.3. Objawy chorobowe wywoływane przez *Bacillus cereus*. 2.4. Epidemiologia infekcji i zatruc pokarmowych na tle *B. cereus*. 3. Podsumowanie

Pathogenic features of bacteria from the *Bacillus cereus* group

Abstract: Increasing interest in *Bacillus cereus* group is connected with the growing number of confirmed foodborne disease cases noted worldwide caused by the group representatives. Sporeforming and ubiquitous in nature, they can easily contaminate food environment and food as such.

The *Bacillus cereus* group comprises 6 species, namely *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* and *B. pseudomycooides*. However, high phenotypic and genetic resemblance makes differentiation between the species difficult.

Toxin production ability coded on plasmids makes it possible for the toxin genes to be lost within few generations. Still, close affinity between the species within the group makes gene transfer from one species to another possible.

1. Introduction. 1.1. The *Bacillus cereus* group characteristics. 2. Pathogenicity of the *B. cereus* group. 2.1. Invasiveness of *B. cereus*. 2.2. Toxins produced by the *B. cereus* group and the mechanism of provoking disease symptoms. 2.2.1. Enterotoxins. 2.2.2. Emetic toxin. 2.2.3. Toxins of other representatives of the *B. cereus* group. 2.2.4. Toxin-like enzymes. 2.3. Disease symptoms caused by *Bacillus cereus*. 2.4. Epidemiology of foodborne diseases caused by *B. cereus* group. 3. Summary

Słowa kluczowe: cereulid, enterotoksyny, grupa *Bacillus cereus*, infekcje pokarmowe

Key words: cereulide, enterotoxins, foodborne diseases, the *Bacillus cereus* group

1. Wstęp

Rodzaj *Bacillus* liczy aktualnie 215 gatunków [38] z czego sześć blisko ze sobą spokrewnionych, tj. *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* [75] i *B. pseudomycooides* [90] tworzy wydzieloną grupę *Bacillus cereus* [59].

Z obecnością laseczek z grupy *B. cereus* w środowisku żywności, wiąże się określone zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Środkami spożywczymi najczęściej wskazywanymi jako nośnik *B. cereus*, w odnotowanych przypadkach zachorowań wywołanych tą bakterią, były produkty zbożowe, makarony, ryż, płatki [46, 76, 91, 104, 109]. Z przypadkami zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* łączono także mięso, mleko, sosy i desery [47, 73, 77, 92, 97]. Suszone produkty mleczne są często zanieczyszczone sporami *B. cereus*, a pokarmy zawierające zarówno składniki mleczne jak i zbożowe, takie jak pokarmy dla niemowląt, niosą większe ryzyko zatrucia tymi bakteriami [20].

1.1. Charakterystyka grupy *Bacillus cereus*

Bakteriami z grupy *B. cereus*, podobnie jak i przedstawicielami rodzaju *Bacillus*, są Gram-dodatnie, ruchliwe, tlenowe lub względnie beztlenowe laseczki,

zdolne do wytwarzania form przetrwanych, naturalnie bytujące w ziemi. Z tego źródła, jako zanieczyszczenie pierwotne lub wtórne, trafiać mogą np. na surowce roślinne i zwierzęce, do środowiska produkcji żywności, na gotowe produkty, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego.

Spory bakterii z grupy *B. cereus* są ciepłooporne a ich decymalny czas redukcji w 100°C określono na 2,2–5,4 min. Formy wegetatywne niektórych przedstawicieli grupy mają zdolność wzrostu w 4–5°C [30, 35]. W określonych warunkach delikatna obróbka cieplna może stanowić bodziec aktywujący spory do kiełkowania, zwiększając ryzyko zatruc pokarmowych na tym tle [68].

Sześć gatunków zaliczanych obecnie do grupy *B. cereus* cechuje znaczne podobieństwo fenotypowe [59] i genotypowe. Zdaniem Carlson i wsp. [29] podobieństwo sekwencji 16S rRNA gatunków *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* i *B. mycoides* przekracza 99%. Różnice w sekwencji rybosomalnego RNA (16S rRNA) szczepów *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* i *B. thuringiensis* dotyczą jedynie 9 nukleotydów [15, 83, 84].

Podobieństwo fenotypowe i genotypowe *B. cereus*, *B. anthracis* i *B. thuringiensis*, jest przyczyną rozbieżności w opiniach bakteriologów co do ich pozycji

systematycznej. Na pytanie, czy są to odrębne gatunki (opcja aktualnie obowiązująca) czy tylko odmiany *B. cereus sensu lato* nie uzyskano, jak dotąd, jednoznacznej odpowiedzi [100].

Jednymi z lepiej poznanych gatunków grupy *Bacillus* są *B. anthracis* i *B. thuringiensis*. Różnią się zjadliwością, rodzajem produkowanych toksyn i docelowym organizmem.

B. anthracis (laseczka wąglika) jest czynnikiem sprawczym śmiertelnej w skutkach choroby zwanej wąglikiem. Poza przeżuwaczami – pierwszymi zwierzętami u których rozpoznano tą chorobę – podobna wrażliwość na *B. anthracis* charakteryzuje wszystkie ssaki [100]. U ludzi *B. anthracis* wywołują może skórną odmianę wąglika (bolesna zmiana na skórze z czarnym środkiem) albo poważną infekcję płuc. Skutkiem wdychania spor *B. anthracis* są, początkowo, objawy przypominające grype, prowadzące do poważnej infekcji płuc która, nie leczona, kończy się zwykle śmiercią.

Cechy odpowiedzialne za zjadliwość szczepów *B. anthracis* są kodowane plazmidowo. Wirulentne szczepy *B. anthracis* są nośnikami 2 dużych plazmidów pXO1(181 kb) i pXO2 (96 kb), w których zakodowana jest informacja dotycząca zdolności do produkcji dwóch toksyn oraz otoczki zbudowanej z kwasu poli- γ -D-glutaminowego [26, 100]. Egzotoksyny *B. anthracis* zbudowane są z 3 białek: antygeny ochronnego (PA = *protective antygen*), czynnika letalnego LF = *lethal factor*) oraz czynnika obrzęku (EF = *edema factor*). Toksyna letalna (PA + LF) prowadzi do wstrząsu anafilaktycznego, prowadzącego do śmierci chorych w wyniku ogólnoustrojowej odmiany wąglika [108].

Toksyna obrzęku (PA + EF), wprowadzona podskórnie, powoduje obrzęk.

B. thuringiensis różni od *B. cereus*, towarzyszące sporulacji, wytwarzanie kryształów protoksyny (kryształiczne białko Cry) – prekursora δ -endotoksyn o działaniu owadobójczym. Spory *B. thuringiensis* to znany biopestycyd. Przez długi czas *B. thuringiensis* uważany był wyłącznie za patogena owadów. Działanie owadobójcze potwierdzone zostało w przypadku 82 serotypów *B. thuringiensis*. Skuteczność bójcza dotyczy głównie owadów z rzędu *Lepidoptera*, *Diptera* i *Koleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera* i *Mallophaga* [70, 100]. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* okazały się także skuteczne w zwalczaniu komarów przenoszących malarię i żółtą febrę, nicieni, roztoczy i pierwotniaków [100].

Praktycznie identyczne geny 16S i 23SrRNA u *B. thuringiensis* i *B. cereus* umożliwiają różnicowanie obu gatunków na podstawie identyfikacji genów kodujących δ -endotoksyny [15, 16, 84, 85].

Rizoidalne kolonie na podłożach agarowych to cecha odróżniająca *Bacillus mycooides* od innych przedstawicieli grupy.

Bacillus weihenstephanensis jest bakterią psychrotolerancyjną zdolną do wzrostu w temp. $<7^{\circ}\text{C}$. Bakteria ta dominowała w pasteryzowanym mleku przechowywanym w 7°C . Nieliczne szczepy produkowały znaczne ilości toksyny NheA, wskazywanej jako jeden z głównych czynników toksyczności *B. cereus* [118]. Za podstawę do wydzielenia *B. weihenstephanensis* z grupy *B. cereus* uznano różnice w sekwencjach 16S rRNA, 23S rRNA, regionu pomiędzy 16S rRNA i 23S rRNA, oraz obecność genów kodujących białka szoku

Tabela I

Cechy różnicujące w grupie *B. cereus*

Cecha	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. anthracis</i>
Morfologia kolonii	Białe	Białe / szare	Rizoidalne	Białe
Hemoliza	+	+	(+)	-
Ruchliwość	+	+	-	-
Oporność na penicylinę	-	-	-	+
Inkluzje kryształowe	-	+	-	-
Barwienie Gramem	+(a)	+	+	+
Katalaza	+	+	+	+
Ruchliwość	+/- (b)	+/-	-(c)	-
Redukcja azotanów	+	+/-	+	+
Rozkład tyrozyny	+	+	+/-	-(d)
Odporność na lizozym	+	+	+	+
Reakcja egg-yolk	+	+	+	+
Beztlenowy rozkład glukozy	+	+	+	+
Reakcja VP	+	+	+	+

a – 90 – 100% szczepów daje reakcję dodatnią

b – 50% szczepów daje reakcję dodatnią

c – 90 – 100% szczepów daje reakcję ujemną

d – większość szczepów daje reakcję ujemną

zimna (homolog *cspA*). *B. weihenstephanensis* może wzrastać w temp. +4 do +7°C, lecz nie rośnie w +43°C – temp. typowej dla *B. cereus* [75]. Określenie czy szczep należy do *B. weihenstephanensis* nie zawsze jest możliwe wg Lechner i wsp. [75], raz z uwagi na obecność zimnolubnych szczepów *B. cereus* a dwa zdolność wytwarzania toksyn identycznych z typowymi dla *B. cereus* [117].

B. pseudomycooides jest bakterią wyróżniającą się odmienną budową kwasów tłuszczowych od pozostałych przedstawicieli grupy *B. cereus* [117].

W tabeli I zestawiono cechy pozwalające na wstępne różnicowanie gatunków w grupie *B. cereus*. Ze względu na brak kompletnych danych uwzględniono cztery z sześciu gatunków należących do tej grupy.

Spokrewnione ze sobą bakterie grupy *B. cereus* różnią się w dużej mierze nie tyle DNA chromosomowym, co DNA episomalnym. Kodowane plazmidowo czynniki wirulencji *B. anthracis* czy produkcja δ -endotoksyn u *B. thuringiensis*, mogą być utracone lub też przekazywane innym szczepom *B. cereus* podczas np. koniugacji [65, 86, 120].

2. Chorobotwórczość *B. cereus*

Chorobotwórczość bakterii grupy *B. cereus* jest determinowana produkcją toksyn i enzymów o charakterze toksyn. Główne z nich to cztery typy hemolizyn, trzy typy fosfolipazy C, toksyna emetyczna i dwa kompleksy enterotoksyn [50, 71, 79, 113].

Aktywność hemolityczna, cytotoksyczna i martwicza, wzrost przepuszczalności naczyń i sekrecji płynów do światła jelita cienkiego łączone są z działalnością enterotoksyn *B. cereus* [2, 22, 78]. Inwazyjność *B. cereus* wiązana jest z zewnętrznymi strukturami komórek tych bakterii, ich hydrofobowością lub hydrofilnością, oraz zdolnością do adhezji i namnażania się w organizmie człowieka.

2.1. Inwazyjność *B. cereus*

Poza błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową u niektórych szczepów grupy *B. cereus* występuje ponadto krystaliczna białkowa, połączona ze strukturami ściany komórkowej, warstwa powierzchniowa, tzw. warstwa S [71]. Komórki wegetatywne wydzielają białka warstwy S w dużych ilościach i czasami odrywają się one od ściany komórkowej. Ruchliwe szczepy grupy *B. cereus* posiadają ułożone perytrichalnie rzęski, jednakże nie wszystkie szczepy wykazują zdolność poruszania się (*B. anthracis*).

W normalnych warunkach *B. cereus* szybko wytwarza subterminalne endospory o wydłużonym kształcie i szczątkowej aktywności metabolicznej, odporne na eks-

tremalne warunki środowiskowe (ogrzewanie, zamrażanie, suszenie, promieniowanie). Poza rolę w rozprzestrzenianiu się *B. cereus* w środowisku, u niektórych szczepów spory stanowią dodatkowy czynnik wirulencji [71]. Hydrofobowa powierzchnia spory ułatwia im przytwierdzenie się do komórek nabłonkowych jelita [6] czy powierzchni roboczych stanowiąc, m.in. poważny problem w środowisku przetwórstwa żywności, np. w przemyśle mleczarskim. Szczepy z grupy *B. cereus* wytwarzają spory o wyjątkowych właściwościach adhezyjnych i silnej, także w porównaniu ze sporami innych *Bacillus* spp., hydrofobowości [6]. Przypuszcza się, że ma to związek z większą zjadliwością szczepów.

Szczepy charakteryzujące się dużą adhezyjnością, mimo dawki infekcyjnej nie przekraczającej 5×10^4 spor (200 spor g^{-1} spożytego pokarmu) były powodem dłuższej trwających i cięższych przypadków zachorowań wymagających hospitalizacji [6]. Przytwierdzone spory, kiełkując w środowisku jelita cienkiego, tworzą formy wegetatywne produkujące enterotoksynę bezpośrednio w miejscu docelowym. Hydrofobowość uważana jest za istotny czynnik warunkujący adhezję, jednak w niektórych przypadkach nie można przewidzieć zdolności adhezyjnych bakterii na podstawie własności hydrofobowych, gdyż zależą one również od takich czynników jak skład pożywki czy faza wzrostu [102].

Uważa się także, że białkowa warstwa S jest ważnym determinantem hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych. W zależności od gatunku bakterie posiadające warstwę S są albo hydrofobowe albo hydrofilne. W przypadku niektórych szczepów *B. cereus* opisanych przez Kotiranta i wsp. [71], warstwa S zwiększała ich hydrofobowość, co powodowało lepszą adhezję komórek do kolagenu typu I, lamininy, fibronektyny i fibrynogenu w porównaniu z komórkami nie posiadającymi tej warstwy. Obecność warstwy S jest konieczna dla efektywnej adhezji komórek bakteryjnych do ludzkich białek strukturalnych. Prawdopodobnie warstwa S zwiększa także oporność komórek wegetatywnych na napromieniowanie [71].

2.2. Toksyny *B. cereus* i mechanizm wywoływania objawów chorobowych

Bacillus cereus jest zdolny do wytwarzania dwóch głównych typów toksyn odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe, tj. enterotoksyn i toksyny emetycznej (wymiotnej).

Poza wymienionymi wyżej bakterie z grupy *B. cereus* mogą produkować różne zewnątrzkomórkowe hemolizyny oraz uważane za potencjalny czynnik zjadliwości enzymy o charakterze toksyn, tj. fosfolipazy C, cereolizynę, sfingomielinazę, cereolizynę AB,

hemolizynę II, hemolizynę BL, hemolizynę III [17] czy hemolizynę podobną do cereolizyny [63].

Cereolizyna jest ciepłolabilną hemolizyną aktywowaną przez grupy tiolowe, wykazującą podobieństwo do streptolizyny O [52]. Jest inaktywowana przez cholesterol, domniemany receptor błonowy.

Także ciepłostabilna hemolizyna II (HlyII), niszczy komórki docelowe i wywołuje ich lizę poprzez działanie na ich błonę. Nie inaktywowana przez cholesterol jest rozpowszechniona wśród bakterii grupy *B. cereus*, w tym *B. thuringiensis* [27]. Należy do tzw. toksyn porotwórczych β -PFT (pore forming toxins), typowych dla bakterii Gram-dodatnich. Działa cytolityczne, jednak jej rola w wirulencji mikroorganizmu pozostaje sprawą otwartą [8]. Przykładem tej samej grupy toksyn jest hemolizyna III (Hly-III). Atakuje błonę erytrocytów w formie monomeru i dopiero wiele monomerów zgromadzonych na powierzchni erythrocyta warunkuje jego lizę. Jest to tzw. mechanizm wielouderzeniowy, typowy dla streptolizyny O i theta-toksyny *Clostridium perfringens* [17]. Inną toksyną należącą do tej samej grupy toksyn jest cytotoksyna K (CytK) [81].

Sfingomielinaza, białko o masie cząst. 34 kDa, przyczepia się do sfingomieliny erythrocytów. Sfingomielinaza, wg Granum i Nissen [50], jest częścią kompleksu wchodzącego w skład enterotoksyn *B. cereus*.

Fosfolipaza C uznawana jest za czynnik zjadliwości wielu bakterii. Sądzi się, że bierze udział w niszczeniu tkanki poprzez pobudzanie degranulacji ludzkich neutrofilii [123]. *B. cereus* produkuje trzy rodzaje fosfolipazy C, z których każda wykazuje inny mechanizm działania. Należą do nich hydrolaza fosfatydyloinozytolu, hydrolaza fosfatydylocholinylu i hemolityczna sfingomielinaza [52]. Hydrolaza fosfatydyloinozytolu rozszczepia fosfatydyloinozytol i pochodne glikozydowe fosfatydyloinozytolu, które zakotwiczą wiele białek do powierzchni błony cytoplazmatycznej [60]. Hydrolaza fosfatydylocholinylu hydrolizuje fosfatydylocholinę, fosfatydoloetanoloaminę i fosfatydyloserynę, podczas gdy sfingomielinaza wykazuje aktywność przeciwko sfingomielinie [52]. Wykazano, że fosfolipaza C *B. cereus* indukuje produkcję strukturalnej metaloproteinazy (MMP) w ludzkich komórkach nabłonkowych, szczególnie żelatynazy o masie cząsteczkowej 92 kDa [42] wspomagając proces leczenia poprzez degradację nabłonka zainfekowanych komórek.

2.2.1. Enterotoksyny *Bacillus cereus*

Biegunkowy typ zatrucia pokarmowego wywołany *B. cereus* może być spowodowany dwoma różnymi białkowymi enterotoksynami, tj. hemolizyną BL (HBL) [21] i niehemolityczną enterotoksyną (NHE) [78]. Obie enterotoksyny składają się z trzech komponentów

białkowych. Wegetatywne komórki *B. cereus* wytwarzają enterotoksyny w jelicie cienkim człowieka, w fazie wzrostu logarytmicznego bakterii. Optymalna temperatura dla produkcji enterotoksyn to 37°C [40]. Wyższa aktywność enterotoksyczna charakteryzuje szczepy zdolne do fermentacji laktozy – wykorzystujące ją jako źródło węgla [47].

Termostabilna trójskładnikowa enterotoksyna HBL składa się z trzech komponentów białkowych: B, L₁ i L₂ [22–24]. o masie cząsteczkowej, odpowiednio, 37 kDa, 38 kDa i 46 kDa. Obecność wszystkich komponentów jest konieczna do wywołania objawów chorobowych [23]. Nie wszystkie szczepy są zdolne do produkcji trzech komponentów tej enterotoksyny [121]. Każda z części białkowych hemolizyny BL jest kodowana genomowo, a jednemu komponentowi odpowiada jedna sekwencja DNA. Wszystkie komponenty HBL ulegają transkrypcji z jednego operonu *hbl* [105] złożonego z *hblC* – kodującego białko L₂, *hblD* – kodującego białko L₁, *hblA* – kodującego białko B i *hblB* – kodującego białko B' (prawdopodobnie substytut białka B), podobnego w 73% do białka B [53]. Nie wszystkie szczepy posiadające operon *hbl* posiadają sekwencję *hblB*, szczególnie że operon *hbl* znajduje się w niestabilnej części chromosomu *B. cereus* [53].

Enterotoksyna HBL wykazuje działanie dermonekrotyczne, wpływa na przepuszczalność naczyń włosowatych i aktywuje jelitową cyklazę adenylanową, co powoduje sekrecję płynów w jelitach (biegunkę). Jeden z modeli opisujących działanie HBL sugeruje, że komponent B jest tym, który wiąże enterotoksynę do powierzchni komórki, zaś komponenty L₁ i L₂ mają działanie lityczne [21]. Każdy komponent hemolizyny BL g. Beecher i Wong [24] łączy się z komórką niezależnie, a następnie tworzy kompleks atakujący błonę komórkową co prowadzi do lizy komórki.

Niehemolityczna toksyna NHE składa się z trzech komponentów białkowych różnych od tych typowych dla HBL. Tymi komponentami są NheA o masie cząst. 41 kDa, NheB o masie cząst. 39 kDa i prawdopodobnie NheC o masie cząst. 105 kDa [80]. Komponent NheA nie jest konieczny do wywoływania objawów chorobowych, a kombinacja dwóch z trzech komponentów toksyny ma działanie biologiczne. Najsilniejsze działanie wykazują jednak wszystkie trzy komponenty obecne jednocześnie [78]. Pierwotnie sądzono, że NheA regulowany jest przez *plcR* [53], jednakże późniejsze badania wykazały, że operon *nhe* u *B. cereus* zawiera trzy otwarte ramki odczytu *nheA*, *nheB* i *nheC*. Pierwsze dwie z nich kodują dwie części toksyny niehemolitycznej – NheA i NheB, funkcja *nheC* jest nieznana. *PlcR* jest natomiast regulatorem transkrypcji zarówno toksyny NHE jak i HBL u *B. cereus* jak i *B. thuringiensis* [54].

Badania nad interakcją między NHE i komórkami Vero pokazały, że komponent NheC może być białkiem łączącym się z komórką, a pozostałe dwa komponenty prawdopodobnie nie są w stanie same wiązać się z powierzchnią komórki [79]. Nadal nie jest jasne czy kompleksy HBL i NHE tylko niszczą błonę plazmatyczną komórki, czy też jakieś komponenty tych toksyn dostają się do cytozolu i wywołują lizę komórki [53]. Jednak wykazano już, że komponent o masie cząst. 105 kDa (NheC) wykazuje działalność kolagenazy i żelatynazy, co może stanowić czynnik zwiększający zjadliwość szczepu [80].

Cytotoksyna K (CytK) wyizolowana z przypadków zatrucia pokarmowego na tle *B. cereus*, była przyczyną zgonu trzech osób z rozpoznaniem martwiczego zapalenia żołądka [81]. CytK jest białkiem wykazującym toksyczność w stosunku do komórek Vero i posiadającym właściwości hemolityczne. Sekwencja DNA kodująca cytotoksynę K wykazuje duże podobieństwo do β -baryłkowych toksyn, w tym do α -toksyny *Staphylococcus aureus* i β -toksyny typu C *Clostridium perfringens* [49, 81]. Wykryto dwa rodzaje cytotoksyny K, o budowie aminokwasowej podobnej w 89%. Pierwszą z nich, nazwaną CytK-1 charakteryzuje wyższa toksyczność w stosunku do komórek ssaków niż CytK-2 [39]. Dane źródłowe sugerują, że geny cytotoksyny K są bardzo rozpowszechnione wśród różnych szczepów należących do grupy *B. cereus* [56, 103 116].

Pierwotnie uważano, że jest jeszcze enterotoksyna T (BcET) [3], brak jednak potwierdzonego przypadku zatrucia pokarmowego wywołanego tą toksyną. Co więcej, enterotoksyna T (41 kDa), w odróżnieniu do innych toksyn *B. cereus*, nie posiada peptydu sygnałowego i z tego względu pozostaje w peryplazmie. Gen *bceT* jest szeroko rozpowszechniony wśród szczepów *B. cereus* [52], jednakże wg Ch o m a i G r a n u m [31] toksyna ta nie jest enterotoksyną, gdyż nie działa toksycznie na komórki nabłonka jelita i nie stymuluje cyklazy adenylowej do konwersji ATP do cAMP.

Podstawowymi testami diagnostycznymi używanymi przy wykrywaniu enterotoksyn są: BCET-RPLA (*Bacillus cereus* Enterotoxin Reverse Passive Agglutination Test), Tecra BDE-VIA (*Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immuno Assay), oraz techniki genetyczne (PCR, sondy molekularne).

2.2.2. Toksyna emetyczna

Toksyna emetyczna (wymiotna), zwana cereulidem, ma formę pierścienia zbudowanego z trzech powtórzeń czterech amino i/lub oksykwasów: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃. Ta struktura pierścieniowa (dodekadepsipeptyd) posiada masę cząsteczkową równą 1,2 kDa i jest zbliżona do jonoforu potasowego walino-

mycyny [1]. Toksyna emetyczna produkowana jest podczas stacjonarnej fazy wzrostu *B. cereus* i wydzielana do środowiska wzrostowego.

Podobnie jak w przypadku innych antybiotyków peptydowych i biologicznie czynnych peptydów wydzielanych przez *B. cereus*, takich jak gramicydyna czy sulfactin, iturin, bitracyna, lichenizyna, polimyksyna i tyrocydina, cereulid jest produkowany przez system NRPS (non-ribosomal peptide synthetases) syntetaz peptydowych [64]. Ten ogromny kompleks enzymatyczny syntetaz peptydowych, występujący u wszystkich szczepów *B. cereus*, jest kodowany genomowo i wykazuje nieznaczne różnice w sekwencji nukleotydowej u szczepów emetycznych, w porównaniu do szczepów nie emetycznych. Toksyna emetyczna nie jest bezpośrednio kodowana genowo, ale system enzymów niezbędny do jej syntezy zakodowany jest w genomie szczepów emetycznych.

Toksyna emetyczna jest ciepło- i kwasoodporna i nie wykazuje działania antygenowego. Nie posiada punktu izoelektrycznego i jest stabilna w temperaturze 121°C przez 90 minut i w pH od 2 do 11, a także nie ulega proteolizie (oporna na działanie pepsyny i trypsyny) [4, 6, 107]. Stąd duże prawdopodobieństwo, że dostaje się do dolnych partii przewodu pokarmowego w formie toksycznej. Wykazuje działanie hamujące na ludzkie białe krwinki o działaniu cytotoksycznym (tzw. killer cells) i tym samym może wpływać na działanie układu immunologicznego. Wymioty są wynikiem połączenia toksyny emetycznej z receptorem 5-HT₃ i stymulacji dośrodkowego nerwu błędnego [2]. Cereulid jest także odpowiedzialny za hamowanie oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach hepatytów wątrobowych, prowadzące do uszkodzenia wątroby [82, 107].

Toksyna emetyczna produkowana jest przez szczepy *B. cereus* należące głównie do serowaru H-1 (urzędowego), a także przez nieliczne szczepy należące do serowarów H-3, H-5 i H-12. Szczepy tzw. biegunkowe, nie produkujące cereulidu, to najczęściej przedstawiciele serotypów H-2, H-6, H-8, H-9 i H-10 [4, 87].

Szczepy emetyczne, wg Carlin i wsp. [28], nie wykazują wzrostu w temperaturach poniżej 10°C (co wyklucza szczepy *B. weihenstephanensis*), za to wszystkie są w stanie rosnąć w 48°C. Co więcej, spory szczepów emetycznych wykazywały wyższą oporność na działanie temperatury 90°C i kiełkowały wolniej w 7°C. Szczepy emetyczne, na ogół, odróżnia od szczepów wywołujących biegunkę, nieznaczna aktywność hemolityczna i brak zdolności do hydrolizy skrobi [97].

Jak wynika z badań Rajkovic [99] ilość produkowanej toksyny emetycznej zależy od szczepu *B. cereus*, składu środowiska wzrostowego, pH środowiska, temperatury i dostępu tlenu. W hodowlach wstrząsanych, w przeciwieństwie do hodowli statycznych,

toksyna emetyczna nie była wytwarzana. W hodowlach statycznych produkcja toksyny miała miejsce w 22°C i 30°C nie zaś w 12°C po 24 godz. Nie obserwowano produkcji cereulidu w pH 6.0 i dużo szybszą produkcję tej toksyny w pH 7.4 niż, w mniej korzystnym dla *B. cereus*, pH 6.4. Najwyższą zdolność produkcji toksyny emetycznej posiadały szczepy rosnące na podłożu TSA, przy czym wzrost kolonii i produkcja toksyny wykazywały wyraźną zależność od zawartości tlenu. Zawartość O₂ <1,6%, zdaniem Rajkovic i wsp. [99], hamuje produkcję toksyny emetycznej. Zdaniem innych autorów, cytowanych przez Rajkovic i wsp. [99], nie jest to tak oczywiste i wiąże się raczej z wyczuwaniem liczebności przez bakterie (QS).

Finlay i wsp. [41] za optymalną dla produkcja cereulidu przez *B. cereus* uznali temperaturę pomiędzy 15 a 30°C, dowodząc, że w temperaturze 37°C produkcja ta jest znikoma lub żadna. Na tej podstawie autorzy ci uznali możliwość produkcji cereulidu w organizmie człowieka za mało prawdopodobną, sugerując, że jedynym powodem wystąpienia objawów wymiotnych jest spożycie toksyny już obecnej w pokarmie.

Ilość toksyny emetycznej w żywności, która wywoływała wymioty, wahała się od 0.02 do 1,28 µg cereulidu g⁻¹ [4]. Ryż i produkty ryżowe są środowiskiem sprzyjającym wytwarzaniu cereulidu przez *B. cereus*. Jednocześnie typ emetyczny zatruć pokarmowych, głównie po spożyciu dań z udziałem ryżu, notowano najczęściej w Japonii [79, 91, 104].

Toksyna emetyczna działa jak jonofor transportujący jony K⁺ do mitochondriów zgodnie z gradientem stężeń i gradientem elektrycznym. Mechanizm ten przypomina działanie walinomycyny. Działanie cereulidu unieczynnia mitochondria, które przestają przeprowadzać procesy oksydoredukcyjne, co objawia się np. zmianą ruchliwości plemników w obrazie mikroskopowym [99]. Stąd też do wykrywania obecności cereulidu stosuje się powszechnie testy na aktywność wakuolityczną, np. testy oparte na badaniu ruchliwości plemników (sperm based biosassay-boar spermatozan motility test), metody chromatograficzne (LC-ion-trap-MS, HPLC-MS), czy techniki genetyczne oparte głównie na PCR [36] w tym RT PCR [45].

Szczepy emetyczne *B. cereus* różnią od pozostałych niektóre cechy biochemiczne (brak amylazy, słaba aktywność hemolityczna), inne wymagania temperaturowe i niewielkie różnice w oporności cieplnej. Szczepy emetyczne wykazują nieznacznie wyższą oporność na ogrzewanie, lecz mniejszą aktywność w niskich temperaturach [28] stąd stanowią potencjalne zagrożenie w żywności podgrzewanej i przetrzymywanej w temperaturze pokojowej (restauracje, bary). żywność przechowywana chłodniczo nie powinna w przypadku tych szczepów stanowić zagrożenia zdrowotnego.

2.2.3. Toksyny innych przedstawicieli grupy *B. cereus*

W grupie *B. cereus* szczepy *B. cereus sensu stricto* są producentami biegunkowej enterotoksyny w około 50%. Analiza przeprowadzona przy użyciu odwrotnej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA – reverse passive latex agglutination) wykazała także, że i *B. thuringiensis* i *B. mycoides* są zdolne do produkcji enterotoksyn [19]. Także w przypadku *B. weihenstephanensis* udowodniono obecność genów kodujących przynajmniej jeden z komponentów toksyn biegunkowych (HBL, NHE lub CytK) [116, 118]

Badania genomu przy użyciu PCR i testy na cytotoksyczność dowiodły, że geny kodujące kompleksy toksyn HBL i NHE są szeroko rozpowszechnione nie tylko u *B. cereus*, ale także u *B. thuringiensis* i *B. mycoides* [43, 58, 98, 101]. Fletcher i Logan [43] prowadząc badania nad cytotoksycznością enterotoksyny znaleźli jeden szczep *B. anthracis* wykazujący słabą działalność cytotoksyczną, zaś Mendelson i wsp. [86] wykryli u *B. anthracis* geny homologiczne do tych kodujących komponent NheA toksyny NHE *B. cereus*. Zdaniem autorów *B. anthracis* jest zdolny produkować białkowy komponent toksyny i że nie jest to równoznaczne ze zjadliwością szczepu producenta. Co ciekawsze, istnieje udokumentowany przypadek infekcji przypominającej węglika wziewnego z którego wyizolowano szczep *B. cereus* posiadający geny toksyny węglikowej [61].

Wykazano również, że szczepy *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. firmus* i *B. simplex* produkują ciepłooporne toksyny, które przypominają toksynę emetyczną *B. cereus* [119]. Częściowe oczyszczenie toksyn uzyskanych ze szczepów *B. megaterium*, *B. simplex* i *B. firmus* pokazało, że działanie tych toksyn jest podobne do cereulidu, tj. wykazuje aktywność wakuolityczną. Wszystkie nowe ciepłostale toksyny wykazywały dużą hydrofobowość, rozpuszczalność w metanolu, lecz żadna z nich nie była identyczna z cereulidem (brak reakcji ze specyficznymi primerami w PCR) [119]. Sugeruje to, że nie tylko *B. cereus* jest czynnikiem etiologicznym zatruć pokarmowych. Co więcej zwraca uwagę na potrzebę prawidłowej identyfikacji izolowanych szczepów.

Bacillus thuringiensis produkuje endotoksyny – białka Cry, które działają specyficznie na niektóre owady [112], a także niebiałkowe egzotoksyny owadobójcze, z których najbardziej znaną jest β-egzotoksyna I, stałocielny i rozpuszczalny w wodzie związek o masie cząsteczkowej równej 701 Da, wydzielany przez około 50% szczepów *B. thuringiensis* [37]. Cry 1, wydzielana np. przez szczepy *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, jest toksyczna w stosunku do rodzaju *Lepidoptera* (ćmy i motyle), Cry 11, produkowana przez *B. thurin-*

giensis subsp. *israelensis*, jest toksyczna w stosunku do insektów z rodzaju *Diptera* (muchy i komary), a Cry 3, wydzielana przez *B. thuringiensis* sbsp. *tenebrionis*, wykazuje działanie przeciwko *Coleoptera* (żuki) [62]. Scharakteryzowano ponad 100 δ -endotoksyn, z których większość wykazuje aktywność insektobójczą. Inne toksyny wytwarzane przez *B. thuringiensis* stanowią białka cytolityczne (Cyt) i nie są one specyficzne przeciwko określonym owadom, lecz wykazują także działanie hemolityczne i cytolityczne w stosunku do komórek ssaczy [33]. Perchat i wsp. [95] stwierdzili, że *B. cereus* także zdolny jest do wytwarzania niebiałkowych toksyn, obok cereulidu, różnych od β -egzotoksyny I. Niektóre szczepy *B. cereus* produkują także białkowe toksyny owadobójcze nazwane Vip [122].

Niebezpieczeństwo stanowi intensywne spryskiwanie roślin uprawnych i warzyw działającymi owadobójczo preparatami *B. thuringiensis*. W skład tych preparatów wchodzi mieszanina endospor i kryształów białkowych toksyn, a produkty zawierające *B. thuringiensis* stanowią 90% preparatów owadobójczych dostępnych na rynku [57]. W związku z możliwą obecnością *B. thuringiensis* na surowcach roślinnych [32, 102, 104], ważne jest by taką żywność przechowywać w sposób zapobiegający kiełkowaniu spor i wzrostowi tych bakterii.

Najbardziej patogennym dla ludzi przedstawicielem grupy *B. cereus* jest laseczka węglikowa – *Bacillus anthracis*. Letalność tej bakterii związana jest z dwoma czynnikami zjadliwości – polisacharydową otoczką, która przeciwdziała fagocytozie, oraz wydzielaniem toksyny węglkowej, która jest cytotoksyczna głównie w stosunku do makrofagów. Na toksynę węglkową składają się trzy białka – antygen ochronny (PA – protective antigen), czynnik obrzęku (EF – endema factor) i czynnik letalny (LF – lethal factor). Białka te funkcjonują razem doprowadzając do apoptozy zainfekowanej komórki. Dwa zjadliwe enzymy – EF i LF, zależą od antygeny ochronnego (PA), który przenosi je do wnętrza komórki. Każde z tych białek samo w sobie nie jest toksyczne dla komórek, a kombinacja wszystkich trzech prowadzi do śmiertelnych objawów węglikowa. Synergistyczne działanie trzech białek prowadzi do zniszczenia komunikacji komórkowej i pozwala bakterii na uniknięcie działania systemu obronnego gospodarza.

Czynnik obrzęku (EF) inaktywuje neutrofile, co zapobiega fagocytozie bakterii, nadaje komórce właściwości cyklazy adenylanowej, prowadzi do zwiększenia w niej cAMP co skutkuje rozregulowaniem procesów wewnątrzkomórkowych (zaburzenie transportu jonów w szczególności), wydzielaniem na zewnątrz komórki elektrolitów i utrata wody.

Czynnik LF także posiada aktywność enzymatyczną i blokuje w komórce szlak transdukcji sygnałów konieczny do prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Obok aktywacji makrofagów pobudza je do pro-

dukcji TNF- α i interleukiny 1- β , co powoduje reakcję zapalną i szok septyczny. Atakuje również komórki śródbłonna, powodując wyciek naczyniowy i wstrząs hipowolemiczny spowodowany utratą krwi. Zjadliwość szczepu *B. anthracis* jest zależna od występowania otoczki zbudowanej z kwasu poli-D-glutaminowego, która jest wytwarzana w organizmie gospodarza, oraz od obecności toksyn. Do zakażenia może dojść drogą pokarmową, oddechową lub poprzez skórę, a źródłem zakażenia są głównie zwierzęta i ich odchody. Obecność toksyn węglkowych jest kodowana plazmidowo [55]. Zdolność bakterii do wytwarzania otoczki jest zdeterminowana genetycznie i jest kodowana na plazmidzie pX02. Do jej wytwarzania konieczna jest ekspresja trzech genów: *capB*, *capC* i *capA* kodujących enzymy związane z błoną komórkową bakterii. Ekspresja tych genów regulowana jest przez oddziaływanie białka kodowanego na plazmidzie pX02 z produktem genu *atxA* znajdującego się na drugim plazmidzie pX01. Plazmid ten determinuje syntezę toksyny. Jak widać synteza otoczki jest częściowo sprzężona z wytwarzaniem toksyn.

Udokumentowany przypadek izolacji szczepu *B. cereus* posiadającego toksynę węglkową, z przypadku infekcji przypominającej węglikowa wziewnego [61] może sugerować możliwość przenoszenia plazmidów między szczepami należącymi do grupy *B. cereus*.

2.2.4. Enzymy

β -laktamazy stanowią przyczynę oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe. U różnych szczepów *B. cereus* zauważono trzy różne formy β -laktamaz. β -laktamaza I należy do klasy A β -laktamaz i jest zewnątrzkomórkową penicylinazą posiadającą serynę w miejscu aktywnym. β -laktamaza II, należąca do klasy B β -laktamaz, jest aktywowana przez przyłączenie jonów Zn (II) i Co(II) [94]. β -laktamaza III należy do klasy A lipoprotein błonowych. Szczepy *B. cereus* izolowane z różnych infekcji były zazwyczaj odporne na antybiotyki β -laktamowe, w tym cefalosporyny trzeciej generacji, ale były wrażliwe na chloramfenikol, klindamycynę, wankomycynę, ciprofloksacynę, erytromycynę, gentamycynę i streptomycynę [5, 33, 104, 115].

Niektóre szczepy *B. cereus* są producentami kolagenozy. Jej produkcja zależy od szczepu i podłoża i jest większa w warunkach beztlenowych niż tlenowych [72]. Kolagenaza degraduje rozpuszczalne i nierozpuszczalne formy kolagenu, żelatynę i bradykininę do małych peptydów.

Proteazy *B. cereus* pełnią prawdopodobnie rolę w infekcjach pozajelitowych. Neutralna proteaza uzyskana ze zjadliwego szczepu *B. cereus* posiadała zdolności hydrolizy hemoglobiny, albuminy i kazeiny [114]. Izolowano także inne proteazy, w tym rozkładające kazeinę i insulinę zawarte w błonie komórkowej [44].

2.3. Objawy chorobowe wywołane przez *Bacillus cereus*

B. cereus jest najlepiej poznanych patogenem grupy *B. cereus*. Pierwsze ognisko zatrucia pokarmowego na tym tle opisane zostało w 1906 r. przez Lubena [69]. Hospitalizowano ogółem 300 osób. Nośnikiem dużej liczby bakterii zidentyfikowanej wówczas jako *B. peptonificans* (później zaklasyfikowanej jako *B. cereus*) były pulpety mięsne. *B. cereus* odpowiada za dwa rodzaje zatruc pokarmowych objawiających się biegunką lub wymiotami. Możliwe jest też łączne wystąpienie obu typów objawów.

Tzw. typ biegunkowy zatrucia, spowodowany jest wprowadzeniem do organizmu, wraz z pokarmem, określonej liczby żywych komórek *B. cereus* (najczęściej spor). Dawka infekcyjna to 10^3 – 10^7 cfu (colony forming units – jednostek tworzących kolonie). Charakteryzuje się zazwyczaj wodnistą biegunką oraz bólami brzucha (objawy przypominające zatrucie na tle *Clostridium perfringens*) pojawiającymi się po 8–16 godz. od spożycia zanieczyszczonej tymi bakteriami żywności. Objawy utrzymują się przeważnie od 12 do 24 godz. Do rzadkości należą przypadki biegunek na tym tle trwających kilka dni. Objawy są skutkiem działania enterotoksyny uwalnianej, przez zakotwiczone w jelicie cienkim gospodarza komórki *B. cereus*. Uwalniana przyżyciowo ciepłolabilna enterotoksyna, aktywuje jelitową cyklazę adenylanową powodując zwiększoną sekrecję płynów w jelicie gospodarza.

Produktami łączonymi najczęściej z przypadkami zakażeń pokarmowych na tym tle są głównie produkty mięsne, zupy, warzywne, puddingi (budynie) i sosy, mleko i produkty mleczne.

Typ wymiotny zatruc pokarmowych to efekt wprowadzenia do organizmu, wraz z pokarmem, wyprodukowanej w nim przez szczepy *B. cereus* toksyny emetycznej – cyklicznego peptydu zwanego cereulidem. Ten typ zatrucia pokarmowego charakteryzuje się nudnościami i wymiotami pojawiającymi się po 0,5–6 godz. od spożycia zanieczyszczonej cereulidem żywności [93] i utrzymującymi się przez 6–24 godz. Symptomy towarzyszące zatruciu na tym tle przypominają zatrucie enterotoksyną gronkowcową. Liczba komórek *B. cereus* zdolna wyprodukować ilość toksyny konieczną do wywołania objawów określana jest na 10^5 do 10^8 cfu \times g⁻¹. Z uwagi na duże różnice w ilości enterotoksyny produkowanej przez różne szczepy *B. cereus*, nawet żywność zawierająca 10^3 cfu *B. cereus* g⁻¹ może okazać się niebezpieczna dla zdrowia konsumenta [53].

Produktami spożywczymi odpowiedzialnymi za ten typ zatrucia pokarmowego są najczęściej smażony i gotowany ryż, makaron, ciastka i kluski [1, 53].

Blisko spokrewniony z *B. cereus* *B. thuringiensis*, wg Jacson i wsp. [66], także jest w stanie wytwa-

rzać enterotoksyny i powodować zatrucia typu biegunkowego. Rosenquist i wsp. [103] wskazali na znaczącą liczebnie obecność *B. thuringiensis* głównie w gotowanych pokarmach skrobiowych oraz surowych warzywach. Zdaniem tych autorów szczepy *B. thuringiensis* mają co najmniej jeden komponent enterotoksyny (HBL lub NHE lub też obu), lecz nie są zdolne do wytwarzania toksyny emetycznej.

B. cereus, oprócz zatruc pokarmowych, może wywoływać i inne schorzenia, szczególnie u osób z obniżoną odpornością, starszych, niemowląt, alkoholików i narkomanów itp. Bakteriami na tym tle należą do rzadkości i są, w większości przypadków, krótkotrwałe i niegroźne.

B. cereus jest natomiast jednym z najważniejszych czynników wywołujących zakażenia oczu takie jak zapalenie rogówki, wewnętrzne zapalenie oka i zapalenie całej gałki ocznej. Drobniewski [33] wylicza 35 przypadków poważnych infekcji oka, a Pina i wsp. [96] opisują przypadek zapalenia rogówki spowodowany kontaktem oka z zanieczyszczonymi *B. cereus* szklami kontaktowymi.

Zakażenia przyranne i infekcje ran powypadkowych i pooperacyjnych są powiązane z produkcją przez *B. cereus* czynnika HBL, czynnika przenikalności naczyniowej martwiczego zapalenia skóry [67]. *B. cereus* jest też dość częstą przyczyną infekcji ran otwartych [34]. W literaturze opisane zostały pojedyncze przypadki perforacji jelit z infekcjami spowodowanymi *B. cereus* u wcześniaka [48], bakteriami z bakteryjnym zapaleniem wsierdza spowodowana infekcją rany przez *B. cereus* [125], martwicza infekcja opon mózgowych wywołana *B. cereus* u pacjenta z leukemią [88], pooperacyjne zapalenie opon mózgowych u dwóch pacjentów wywołane zanieczyszczeniem szpitalnej pościeli [18], zapalenie opon mózgowych u pacjenta z przetoką komorową [25], trzy przypadki szoku septycznego i śpiączki u pacjentów z leukemią [89], nagłe uszkodzenie wątroby spowodowane emetycznym szczepem *B. cereus* [92], zapalenie płuc u pacjenta z upośledzoną odpornością [33], infekcje przewodu moczowego [110], czy wreszcie martwicze zapalenie żołądka u pacjenta z obniżoną odpornością [74].

2.4. Epidemiologia infekcji i zatruc pokarmowych na tle *B. cereus*

Według danych CDC (Centre for Disease Control and Prevention) *B. cereus* odpowiada za mniej niż 1% ogniskowych zatruc pokarmowych w USA [9] a liczba odnotowywanych przypadków, rocznie, waha się od 6 do 50. Jednak, zdaniem znawców problemu, faktyczna liczba przypadków zatruc pokarmowych na tym tle może być znacznie większa.

Porównanie skali tego zjawiska w różnych krajach jest utrudnione z uwagi na dobrowolny charakter takiej ewidencji. Dostępne dane dotyczące Europy (Tab. II) wskazują na przewagę 1–2 ognisk zachorowań spowodowanych infekcją *B. cereus* rocznie w większości porównywanych krajów w latach 1999–2000 [124]. Zdecydowanie więcej przypadków zachorowań na tym tle odnotowano w Holandii, Norwegii czy na Węgrzech. Na Węgrzech np. liczba przypadków w ognisku zachorowań na tle *B. cereus* w 2000 r. przekraczała 40. Dane źródłowe potwierdzały, że do zachorowań na tym tle dochodziło przeważnie w miejscach zbiorowego żywienia, takich jak. restauracje, stołówki, hotele, itp.

W Polsce, w latach 1998–2001, 37 do 313 przypadków bakteryjnych zatruc pokarmowych (średnio 88 rocznie) zaklasyfikowano jako spowodowane przez „inne bakterie, w tym *B. cereus* i *V. parahaemolyticus*”. W kolejnych latach (2002 i 2003) liczba zachorowań wywołanych przez „inne bakterie” dotyczyła, odpowiednio, 317 i 110 przypadków [106].

Nieliczne dostępne dane dotyczące *B. cereus* jako czynnika sprawczego zatruc pokarmowych (z wyłączeniem infekcji wirusowych) dowodzą, że bakterie te odpowiadały np. za 8.5% przypadków zachorowań w Holandii w 1991r. i 5% w Danii w latach 1990–1992 [106]. Dużo niższą zapadalność na tym tle notowano, np. w Anglii i Walii (0,7%), Japonii (0,8%), USA (1,3%) czy Kanadzie (2,2%) [53]. W Holandii, Anglii i Walii w latach 1993–2000 *B. cereus* był przyczyną ok. 2% łącznej liczby ognisk zatruc pokarmowych o znanej etiologii [124]. We Francji częstość zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* określa się na 4–5%, a w Stanach Zjednoczonych 1–2% ogółu odnotowanych [103].

Dane dotyczące liczby ognisk/przypadków zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* zgłoszonych w USA, Australii i Nowej Zelandii w latach 2001–2005, potwierdzają niewielką skalę tego zjawiska (Tab. III). Przy jednocyfrowej liczbie ognisk zachorowań na tym tle, liczba przypadków w ognisku, w badanym okresie, rzadko przekraczała 20. Jednocześnie z odnotowanych

Tabela II
Liczba zgłoszonych zatruc pokarmowych na tle *Bacillus cereus* w latach 1998–2000 [124]

Kraj	1998		1999		2000	
	Ogniska	Przypadki	Ogniska	Przypadki	Ogniska	Przypadki
Anglia i Walia	0	0	1	–	0	0
Finlandia	3	29	1	5	2	12
Francja	7	–	2	–	13	–
Holandia	–	–	10	31*	14	165**
Islandia	1	2	2	10	0	0
Niemcy	–	–	2	16	2	26
Norwegia	5	–	7	145	7	104
Polska	–	–	0	0	1	36
Portugalia	–	3	1	7	1	6
Rosja	–	–	1	53	0	0
Słowenia	–	–	1	68	0	0
Szkocja	1	–	1	–	0	0
Szwecja	2	5	1	2	1	2
Węgry	5	177	4	139	2	88
Włochy	1	–	2	10	1	8

* 1 przypadek choroby poza zgłoszonymi ogniskami
 ** 3 przypadki choroby poza zgłoszonymi ogniskami choroby
 – brak danych

Tabela III
Liczba zgłoszonych zatruc pokarmowych na tle *Bacillus cereus* w latach 2001–2005 w Australii, Nowej Zelandii i USA [9, 11–13]

Kraj	2001		2002		2003		2004		2005		Źródło informacji
	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P	
USA	5	61	7	42	2	50	6	103	3	37	[9]
Australia	–	–	1	37	–	–	1	6	–	–	[11–13]
Nowa Zelandia	6	21	4	16	6	25	0	1	5*	10*	

* *Bacillus* spp.; – brak danych

przypadków zachorowań oprócz *B. cereus* izolowano innych przedstawicieli rodzaju *Bacillus* (Tab. III).

Typ zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* różni się zależnie od kraju. W Japonii np. dominuje typ emetyczny, natomiast w Europie i USA są to najczęściej infekcje pokarmowe typu biegunkowego.

3. Podsumowanie

Wzrastające zainteresowanie grupą *Bacillus cereus* związane jest z coraz częstszym izolowaniem tych bakterii ze zdiagnozowanych przypadków zachorowań na tym tle.

Grupa *B. cereus* stanowią drobnoustroje wszędo- bylskie, sporotwórcze, a co za tym idzie, obecne w środowisku związanym z produkcją, przetwórstwem żywności i żywnością jako taką.

Grupę *B. cereus* reprezentuje aktualnie sześć gatunków: *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*. Niewielkie różnice w fenotypie przedstawicieli grupy sprawiają, że rozróżnienie ich za pomocą klasycznych metod diagnostycznych nie jest możliwe. Co więcej, duże podobieństwo dotyczy także rodzaju toksyn produkowanych zarówno przez przedstawicieli grupy *B. cereus* jak i rodzaju *Bacillus* takich jak np. *B.licheniformis*, *B. megaterium*, *B. simplex* czy *B. firmus*.

To, że rodzaj i ilość wytwarzanych przez *B. cereus* toksyn zależy od warunków środowiskowych (temperatury, pH, dostępności tlenu, składników dostępnych w środowisku) oraz szczepu producenta sprawia, że produktem spożywczym zagrażającym zdrowiu konsumenta może być już produkt zawierający 10^3 komórek lub spor w 1 g.

Zdolność do produkcji niektórych toksyn kodowana plazmidowo, sprawia, że odpowiedzialne za taką zdolność geny mogą być utracone w ciągu kilku pokoleń (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*) lub przeniesione na inne blisko spokrewnione gatunki grupy *B. cereus*. Bliskie pokrewieństwo *B. cereus* do *B. anthracis* stwarza możliwość występowania szczepów *B. cereus* posiadających toksyny węgla. Bliskie pokrewieństwo *B. thuringiensis* i *B. cereus* niesie ze sobą realne ryzyko zatruc pokarmowych przez *B. thuringiensis*. Powszechnie stosowany jako preparat owadobójczy w hodowli roślin, *B. thuringiensis*, podobnie jak inni przedstawiciele grupy *B. cereus* był już izolowany z przypadków zatruc pokarmowych.

Piśmiennictwo

1. Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 31–34 (1994)
2. Agata N., Ohta M., Arakawa Y., Mori M.: The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*, **141**, 983–988 (1995)
3. Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 17–20 (1995)
4. Agata N., Ohta M., Mori M.: Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* **33**, 67–69 (1996)
5. Alfaro D.V., Davis J., Kim S., Bia F., Bogard J.F., Briggs J.W., Liggett P.E.: Experimental *Bacillus cereus* posttraumatic endophthalmitis and treatment with ciprofloxacin. *Br. J. Ophthalmol.* **80**, 755–758 (1996)
6. Andersson A., Granum P.E., Rønner U.: The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 93–99 (1998)
7. Andersson M.A., Mikkola R., Helin J., Andersson M.C., Salkinoja-Salonen M.: A novel sensitive bioassay for the detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1338–1342 (1998)
8. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Yurkov I.S., Budarina Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S.: Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expression Purification*, **47**, 186–193 (2006)
9. Anonim 1: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm (30 maja 2007)
10. Anonim 2: <http://www.hps.scot.nhs.uk/ewr/subjectsummary.aspx?subjectid=71> (30 maja 2007)
11. Anonim 3: http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_outbreak.php?we_objectID=127 (30 maja 2007)
12. Anonim 4: http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_surveillance.php (30 maja 2007)
13. Anonim 5: http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_outbreak.php (30 maja 2007)
14. Asano S.-I., Nukumizu Y., Bando H., Iizuka T., Yamamoto T.: Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1054–1057 (1997)
15. Ash C., Collins M.D.: Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**, 75–80 (1992)
16. Ash C., Farrow J.A.E., Dorsch M., Stackenbrandt E., Collins M.D.: Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 343–346 (1991)
17. Baida G.E., Kuzmin N.P.: Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. Rapid report. *Biochem. Biophys. Acta*, **1284**, 122–124 (1996)
18. Barrie D., Wilson J.A., Hoffman P.N., Kramer J.M.: *Bacillus cereus* meningitis in two neurosurgical patients: an investigation into the source of the organism. *J. Infect.* **25**, 291–297 (1992)
19. Beattie S.H., Williams H.G.: Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 221–225 (1999)
20. Becker H., Schaller G., Von Wiese W., Terpian G.: *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 1–15 (1994)
21. Beecher D.J., MacMillan J.D.: Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **59**, 1778–1784 (1991)

22. Beecher D.J., Schoeni J.L.: Wong A.C.L., Enterotoxin activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **63**, 4423–4428 (1995)
23. Beecher D.J., Wong A.C.L.: Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **62**, 980–986 (1994)
24. Beecher D.J., Wong A.C.L.: Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **272**, 233–239 (1997)
25. Berner R., Heinen F., Pelz K., Van Velthoven V., Sauer M., Korinthenberg R.: Ventricular shunt infection and meningitis due to *Bacillus cereus*. *Neuropediatrics*, **28**, 333–334 (1997)
26. Brossier F., Mock M.: Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*, **39**, 1747–1755 (2001)
27. Budarina Z. I., Sinev M.A., Mayorov S.G., Tomashevski A.Y., Shmelev I.V., Kuzmin N.P.: Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol.* **161**, 252–257 (1994)
28. Carlin F., Fricker M., Pielaat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salkinoja Salonen M., Svensson B., Nguyen-The C., Ehling-Schulz M.: Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* **109**, 132–138 (2006)
29. Carlson C.R., Johansen T., Kolsto A.B.: The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 163–167 (1996)
30. Choma C., Clavel T., Dominguez H., Razafindramboana N., Soumille H., Nguyen-The C., Schmitt P.: Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 73–77 (2000)
31. Choma C., Granum P.E.: The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 115–119 (2002)
32. Damgaard P.H., Hansen B.M., Pederson J.C., Ellenberg J.: Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 253–258 (1997)
33. Drobniowski F.A.: *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 324–338 (1993)
34. Dubouix A., Bonnet E., Alvarez M., Bensafi H., Archambaud M., Chaminade B., Chabanon G., Marty N.: *Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J. Infect.* **50**, 22–30 (2005)
35. Dufrenne J., Bijwaard M., te Giffel M., Beumer R., Notermans S.: Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **27**, 175–183 (1995)
36. Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S.: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 189–195 (2004)
37. Espinasse S., Gohar M., Chaufaux J., Buisson C., Perchat S., Sanchis V.: Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cryIB in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4182–4186 (2002)
38. Euzéby J. P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>. (2005)
39. Fagerlund A., Ween O., Lund T., Hardy S.P., Granum P.E.: Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **150**, 2689–2697 (2004)
40. Fermanian C., Lapeyre C., Fremy J.M., Claisse M.: Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. *J. Food Microbiol.* **30**, 345–358 (1996)
41. Finlay W.J., Logan N.A., Sutherland A.D.: *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 385–389 (2000)
42. Firth J.D., Putnins E.E., Larjava H., Uitto V.J.: Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 4931–4936 (1997)
43. Fletcher P., Logan N.A.: Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 394–400 (1999)
44. Fricke B., Buchmann T., Friebe S.: Unusual chromatographic behaviour and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. *J. Chromatogr. A.* **715**, 247–258 (1995)
45. Fricker M., Messelhäusser U., Busch U., Scherer S., Ehling-Schulz M.: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1892–1898 (2007)
46. Giffel M.C., Beumer R.R., Granum P.E., Rombouts F.M.: Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 307–318 (1997)
47. Giffel M.C., Beumer R.R., Leijendekkers S., Rombouts F.M.: Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiol.* **13**, 53–58 (1997)
48. Girish M., Ries M., Cenker M., Carbon R., Rauch R., Hofbeck M.: Intestinal perforations in a premature infant caused by *Bacillus cereus*. Case report. *Infection*, **31**, 192–193 (2003)
49. Gouaux E.: α -hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of β -barrel, channel-forming toxins. *J. Struct. Biol.* **121**, 110–122 (1998)
50. Granum P.E., Anderson A., Gayther C., te Giffel M., Larsen H., Lund T., O'Sullivan K.: Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 145–149 (1996)
51. Granum P.E., Lund T.: Mini review: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 223–228 (1997)
52. Granum P.E., Nissen H.: Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex' produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**, 97–100 (1993)
53. Granum P.E., O'Sullivan K., Lund T.: The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 225–229 (1999)
54. Granum P.E.: *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **76**, 61S–66S (1994)
55. Green, B.D., Battisti, L., Koehler, T.M., Thorne, C.B., Ivins, B.E.: Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **49**, 291–297 (1985)
56. Guinebretiere M.H., Broussolle V., Nguyen-The C.: Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3053–3056 (2002)
57. Hansen B.M., Damgaard P.H., Eilenberg J., Pedersen J.C.: *Bacillus thuringiensis*. Ecology and environmental effects of its use for microbial pest control. Report no. 316, (2006) Danish Environmental Protection Agency. [cyt. za: Rosenquist H., Smidt L., Andersen S.R., Jensen G., Wilcks A.: Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 129–136 (2005)]
58. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185–189 (2001)
59. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 209–213 (2001)

60. Heinz D.W., Ryan M., Smith M.P., Weaver L.H., Keana J.F., Griffith O.H.: Crystal structure of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with glycosaminyl (alpha 1—>6)-D-myo-inositol, an essential fragment of GPI anchors. *Biochemistry*, **35**, 9496–9504 (1996)
61. Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C. K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S., Galloway D.R., Read T.D., Popovic T., Fraser C.M.: Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8449–8454 (2004)
62. Hofte H., Whiteley H.R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242–255 (1989)
63. Honda T., Shiba A., Seo S., Yamamoto J., Matsuyama J., Miwatani T.: Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 205–210 (1991)
64. Horwood P.F., Burgess G.W., Oakey H.J.: Evidence for a non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**, 319–324 (2004)
65. Hu X., Hansen B.M., Eilenberg J., Hendriksen N.B., Smidt L., Yuan Z., Jensen G.B.: Conjugative transfer, stability and expression of plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 45–52 (2004)
66. Jackson S.G., Goodbrand R.B., Ahmed R., Kasatiya S.: *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 103–105 (1995)
67. Kemmerly S.A., Pankey G.A.: Oral ciprofloxacin therapy for *Bacillus cereus* wound infection and bacteriemia. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 189 (1993)
68. Kim J., Foegeding P.M.: Effects of heat-treatment, CaCl₂-treatment and ethanol-treatment on activation of *Bacillus sporus*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 414–420 (1996)
69. Kniehl E., Becker A., Forster D.H.: Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *J. Hosp. Inf.* **55**, 33–38 (2003)
70. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K.: Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *J. Invertebrate Pathol.* **94**, 56–63 (2007)
71. Kotiranta A., Haapasalo M., Kari K., Kerosuo E., Olsen I., Sorsa T., Meurman J.H., Lounatmaa K.: Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect. Immunol.* **66**, 4895–4902 (1998)
72. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M.: Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microb. Inf.* **2**, 189–198 (2000)
73. Larsen H.D., Jørgensen K.: The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 179–186 (1997)
74. Le Scanff J., Mohammedi I., Thiebaut A., Martin O., Argaud L., Robert D.: Necrotizing Gastritis due to *Bacillus cereus* in an Immunocompromised Patient. *Infection*, **34**, 98–99 (2006)
75. Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruss B.M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S.: *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Microbiol.* **48**, 1373–1382 (1998)
76. Lee P.K., Buswell J.A., Shinagawa K.: Technical report: distribution of toxigenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong Kong. *World J. Microbiol. Biot.* **11**, 696–698 (1995)
77. Lin S., Schraft H., Odumeru J.A., Griffiths M.W.: Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 159–171 (1998)
78. Lund T., Granum P.E.: Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 151–156 (1996)
79. Lund T., and Granum P.E.: Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **143**, 3329–3339 (1997)
80. Lund T., De Buyser M.-L., Granum P.E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molec. Microbiol.* **38**, 254–261 (2000)
81. Lund T., Granum P.E.: The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**, 355–361 (1999)
82. Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bär W., Krähenbühl S.: Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New Eng. J. Medicine*, **336**, 1142–1148 (1997)
83. Mantinen V., Lindström K.: A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 1634–1639 (1998)
84. Manzano M., Coccolin L., Cantoni C., Comi G.: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 249–254 (2003)
85. McKilip J.L.: Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Anatome Leeuwenhoek*, **77**, 393–399 (2000)
86. Mendelson I., Tobery S., Scorpio A., Bozue J., Shafferman A., Friedlander A.M.: The NheA component of the non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* is produced by *Bacillus anthracis* but is not required for virulence. *Microbiol. Pathol.* **37**, 149–154 (2004)
87. Mikami T., Horikawa T., Murakami T., Matsumoto T., Yamatawa A., Murayama S., Katagiri S., Shinagawa K., Suzuki M.: An improved method for detecting cytostatic toxic (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 53–58 (1994)
88. Motoi N., Ishida T., Nakano I., Akiyama N., Mitani K., Hirai H., Mazaki Y., Machinami R.: Necrotizing *Bacillus cereus* infection of the meninges without inflammatory reaction in a patient with acute myelogenous leukemia: a case report. *Acta Neuropathol.* **93**, 301–305 (1997)
89. Musa M.O., Douri M.A., Khan S., Shafi T., Al Humaidh A., Al Rasheed A.: Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three case reports. *Case Rep.* 154–156 (1999)
90. Nakamura L.K.: *Bacillus pseudomycooides* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1031–1035 (1998)
91. Nichols G.L., Little C.L., Mithani V., de Louvois J.: The microbiological quality of cooked rice from restaurants and take-away premises in the United Kingdom. *J. Food Prot.* **62**, 877–882 (1999)
92. Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., te Giffel M., Peeters-Weem P.: A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* **14**, 143–151 (1997)

93. Ombui J.N., Schmieger H., Kaliko M.M., Arimi S.M.: *Bacillus cereus* May produce two or more diarrheal enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**, 245–248 (1997)
94. Orellano E.G., Girardini J.E., Cricco J.A., Ceccarelli E.A., Vila A.J.: Spectroscopic characterization of bionuclear metal site in *Bacillus cereus* β -lactamase II. *Biochemistry* **37**, 10173–10180 (1998)
95. Perchat S., Buisson C., Chaufaux J., Sanchis V., Lereclus D., Gohar M.: *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. *J. Invert. Path.* **90**, 131–133 (2005)
96. Pinna A., Sechi L.A., Zanetti S., Usai D., Delogu G., Cappuccinelli P., Carta F.: *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. *Ophthalm.* **108**, 1830–1834 (2001)
97. Pirhonen T.I., Andersson M.A., Jääskeläinen E.L., Salkinoja-Salonen M.S., Honkanen-Buzalski T., Johansson T.M.-L.: Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in pasta and meat dish associated with a food poisoning case. *Food Microbiol.* **22**, 87–91 (2005)
98. Prüss B.M., Dietrich R., Nibler B., Märtilbauer E., Scherer S.: The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of *Bacillus cereus* group. *Appl. Environment. Microbiol.* **65**, 5436–5442 (1999)
99. Rajkovic A., Uyttendaele M., Deley W., Van Soom A., Rijsselaere T., Debevere J.: Dynamics of boar semen motility inhibition on a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide). *J. Microbiol. Meth.* **65**, 525–534 (2006)
100. Rasko D.A., Altherr M. R., Han C. S., Ravel J.: Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 303–329 (2005)
101. Rivera A.M.G., Granum P.E., Priest F.G.: Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 151–155 (2000)
102. Rosenberg E., Brown D.R., Demain A.L.: The influence of gramicidin S on hydrophobicity of germinating *Bacillus brevis* spores. *Arch. Microbiol.* **142**, 51–54 (1985)
103. Rosenquist H., Smidt L., Andersen S.R., Jensen G.B., Wilcks A.: Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 129–136 (2005)
104. Rusul G., Yaacob N.H.: Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 131–139 (1995)
105. Ryan P.A., Macmillan J.M., Zilinskas B.A.: Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **179**, 2551–2556 (1997)
106. Sadkowska-Todys M., Stefanoff P., Łabuńska E.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2003 r. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 269–279 (2005)
107. Sakurai N., Koike K.A., Rie Y., Hayashi H.: The rice culture filtrate of *Bacillus cereus* isolated from emetic-type food poisoning causes mitochondrial swelling in HEp-2 Cell. *Microbiol. Immunol.* **38**, 277–343 (1994).
108. Salyers A.A., Whitt D. D.: Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. PWN, Warszawa 2003, 442–445
109. Sarriás J.A., Valero M., Salmerón M.C.: Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* **19**, 589–595 (2002)
110. Sato K., Ichiyama S., Ohmura M., Takashi M., Agata N., Ohta M., Nakashima N.: A case of urinary tract infection caused by *Bacillus cereus*. *J. Infect.* **36**, 247–248 (1998)
111. Schmidt K.: WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Sixth Report 1990–1992. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin 1995
112. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
113. Shinagawa K., Konuma H., Sekita H., Sugii S.: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 87–90 (1995)
114. Sierecka J.K.: Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 579–595 (1998)
115. Steen M.K., Bruno-Murtha L.A., Chau G., Lazzar H., Bernard S., Sulis C.: *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 945–946 (1992)
116. Stenfors L. P., Mayr R., Scherer S., Granum P.E.: Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 47–51 (2002)
117. Stenfors L.P., Granum P.E.: Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 223–228 (2001)
118. Svensson B., Monthán A., Guinebretière M-H., Nguyen-The Ch., Christiansson A.: Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. *Int. Dairy J.* **17**, 1201–1208 (2007)
119. Taylor J.M.W., Sutherland A.D., Aidoo K.E., Logan N.A.: Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 313–317 (2005)
120. Van der Auwera G. A., Timmerly S., Hoton F., Mahillon J.: Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 164–172 (2007)
121. Veld in't P.H., Ritmeester W.S., Delfgou-van Asch E.H.M., Duffrenne J.B., Wernars K., Smit E., van Leusden F.M.: Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 63–70 (2001)
122. Warren G.W., Koziel M.G., Mullins M.A., Nye G.J., Carr B., Desai N.M., Kostichka K., Duck N.B., Estruch J.J.: Novel pesticidal proteins and strains. USA Patent No. WO96/10083 (1996)
123. Wazny T.K., Mumman N., Styr B.: Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. *European J. Clin. Infect. Dis.* **9**, 830–832 (1990)
124. WHO, Surveillance Programme for Control of Foodborne Infection and Intoxications in Europe, 8th report 1993–1998 and 1999–2000 (2000)
125. Zabransky R.J.: *Bacillus cereus* septicemia with probable endocarditis. *Clin. Microbiol. Newslett.* **20**, 176–178 (1998)