

**VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
SEKTOR ZA PREVENTIVNU MEDICINU
INSTITUT ZA MIKROBIOLOGIJU**

DEJANA SAVIĆ

**FENOTIPSKU I GENOTIPSKU KARAKTERISTIKU
IZOLATA BAKTERIJE *BACILLUS CEREUS*
POREKLOM IZ RAZLIČITOG MATERIJALA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015. godine

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE:

Mentor: Prof. dr Elizabeta Ristanović, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane, Beograd

Predsednik komisije: Prof. dr Sonja Radaković, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane, Beograd

Članovi komisije:

Prof. dr Biljana Miljković Selimović, Medicinski fakultet, Univerziteta Niš

Naučni savetnik dr Zorica Lepšanović, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane

Vanr. prof. dr Zoran Tambur, Stomatološki fakultet, Pančevo

Datum odbrane: _____ 2016. godine

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1	<i>Bacillus cereus</i> grupa	3
2.2	Vrsta <i>Bacillus cereus</i>	4
2.2.1	Opis vrste	4
2.2.2	Spore kod vrste <i>B. cereus</i>	6
2.2.3	Genom vrste <i>B. cereus</i>	8
2.2.4	Kultivacija i identifikacija vrste <i>B. cereus</i>	9
2.2.5	<i>B. cereus</i> u okruženju i u hrani	11
2.3	Trovanje bakterijom <i>B. cereus</i> iz hrane	13
2.3.1	Intoksikacija dijarejalnim toksinom bakterije <i>B. cereus</i>	14
2.3.2	Intoksikacija emetičnim toksinom bakterije <i>B. cereus</i>	17
2.3.3	Sojevi <i>B. cereus</i> koji produkuju emetični toksin	19
2.3.4	Metode za detekciju i kvantifikaciju emetičnog toksina kod vrste <i>B. cereus</i>	20
2.3.5	Produkcija emetičnog toksina u različitim uslovima	21
2.4	Osetljivost sojeva <i>B. cereus</i> na antibiotike	23
2.5	Molekularne metode za tipizaciju sojeva <i>B. cereus</i>	26
3.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
4.	MATERIJAL I METODE	30
4.1	PLAN ISTRAŽIVANJA	30
4.2	MATERIJAL	30
4.2.1	Uzorci za ispitivanje	30
4.2.2	Referentni soj	30

4.3	METODE	31
4.3.1	Kultivacija i identifikacija sojeva <i>B. cereus</i>	31
4.3.2	Biohemijska identifikacija <i>B. cereus</i>	32
4.3.3	Ispitivanje osetljivosti sojeva <i>B. cereus</i> na antibiotike disk-difuzionom metodom	32
4.3.4	Molekularne metode identifikacije i karakterizacije sojeva <i>B. cereus</i>	35
4.3.4.1	Izolacija DNK	35
4.3.4.2	Lančana reakcija polimeraze (PCR)	35
4.3.4.3	Gel elektroforeza	36
4.3.4.4	RAPD	37
4.4	Statistička analiza	38
5.	REZULTATI	39
5.1	Osetljivost na antibiotike izolata <i>B. cereus</i>	41
5.2	Detekcija gena za enterotoksine i emetični toksin	46
5.3	Genetička karakterizacija (tipizacija) izolata <i>B. cereus</i> RAPD analizom	53
6.	DISKUSIJA	59
7.	ZAKLJUČCI	70
8.	LITERATURA	72

1. UVOD

Hrana i voda su značajni rezervoari mikroorganizama koji dovode do obolevanja i smrti u svetu. Poslednjih decenija učestalost infekcija nakon uzimanja mikrobiološki neispravne hrane je porasla (Varnam i Evans, 1991), iako se u prehrambenoj industriji intezivno radilo na poboljšanju higijene u proizvodnji i obradi namirnica. Razlozi za ovaj porast mogu se povezati sa poslednjim trendovima u globalnoj proizvodnji hrane u industrijalizovanim zemljama, iako je mikrobiološka kontrola hrane obavezna i od vitalnog značaja (Žlender, 2003). Upotreba velikog broja antimikrobnih preparata, kako bi se pospešio rast i povećao prinos kultura u poljoprivredi, doveli su do favorizovanja bakterijskih vrsta otpornih na njih, a sa tim i do njihovog uključivanja u lanac ishrane. Isto tako, urođena sposobnost mikroorganizama da se mutiranjem prilagode na različite faktore iz okoline ima značajnu ulogu u sistemu proizvodnje i bezbednosti hrane. S druge strane, masovna proizvodnja polu pripremljene i pripremljene hrane sa dužim rokom trajanja i njihovo čuvanje na neadekvatnoj temperaturi omogućila je razvoj sporogenih, termofilnih vrsta. Nauka i stručna literatura opisuju više od 200 poznatih bolesti koje se prenose hranom, a posebno su važne toksikoinfekcije izazvane unošenjem mikroorganizama hranom, koji se u digestivnom traktu razmnožavaju i stvaraju jedan ili više toksina (Smole Možina i Grom Hočevar, 2004).

Značajan rizik u prehrambenoj industriji predstavljaju bakterije iz roda *Bacillus*, zbog sveprisutnosti i sposobnost da formiraju spore, koje su veoma otporne na toplotu, sušenje, zračenja i druge negativne uticaje iz okruženja. Ovaj rod spada među jedne od najznačajnijih uzročnika trovanja hranom u mnogim zemljama. *Bacillus cereus* (*B. cereus*), od svih vrsta ovog roda najčešće izaziva alimentarne intoksikacije i toksikoinfekcije kod ljudi. Intoksikacija je unošenje prethodno stvorenog toksina, a toksikoinfekcije podrazumeva ulazak mikroorganizma u organizam, razmnožavanje i produkciju toksina. Ova oboljenja su povezana sa konzumiranjem različitih prehrambenih proizvoda, u kojima dominiraju skrob i proteini, kao što su: pirinač, meso i mesne prerađevine, dezerti i konzervisana hrana. *B. cereus* se razmnožava u temperaturnom intervalu od 10-45 °C, a optimalna temperatura iznosi oko 35 °C. Spore *B. cereusa* su termorezistentne i mogu preživeti temperature iznad 100 °C. Veoma često je prisutan kao

kontaminant namirnica animalnog i biljnog porekla, jer zbog otpornih spora može praživeti različite fizičke i hemijske uslove njihove obrade i pripreme. Pri optimalnim fizičko-hemijskim uslovima *B. cereus* produkuje dve vrste toksina: emetični toksin i enterotoksine.

Emetični toksin, cereulin, dovodi do pojave emetičnog sindroma koji se kod ljudi manifestuje obilnim povraćanjem. Nakon svega 1-6 sata nakon konzumiranja kontaminirane hrane javljaju se simptomi, a infekcija traje 24 sata i kraće. Ove simptome je veoma teško razlikovati od simptoma koje prouzrokuje *Clostridium perfringens*. Termorezistentn spore bakterije *B. cereus* preživljavaju termičku obradu pirinča i ukoliko se pirinač čuva duži vremenski period na sobnoj temperaturi, doći će do rasta i razmnožavanja vegetativnih oblika, kao i do produkcije toksina. Emetični sindrom je često povezan i sa konzumiranjem kontaminiranog sira, mleka u prahu, supe i pudinga. Spore su hidrofobne i vezuju se za površinu namirnica (Jay i sar., 2005; Granum, 2007).

Enterotoksini dovode do dijareje i abdominalnih bolova. Enterotoksini uzročnici dijareje su termolabilni i sintetišu se u hrani i u tankom crevu. Inkubacioni period traje između 8-16 sati i pojava simptoma povezana je sa konzumiranjem mesa i mesnih preradevina, povrća, začina i dodataka jelima, koji se pre konzumiranja duži vremenski period drže na sobnoj temperaturi. Kako enterotoksini nisu stabilni na povišenoj temperaturi, izlaganje i obrada namirnica na visokoj temperaturi uništava ove toksine, a samim tim onemogućava i razvoj oboljenja (Ehling - Schulz i sar, 2004b; Leuschner 2003; Horwood i sar. 2004; Granum i Baird - Parker, 2000).

Međutim, bez obzira na različite simptome i dužinu njihovog trajanja, poznati su slučajevi sa smrtnim ishodom nakon konzumiranja hrane kontaminirane i emetičnim i enterotoksinom (Mahler i sar., 1997; Dierick i sar., 2005).

Da bi došlo do pojave alimentarne toksikoinfekcije u organizam je potrebno uneti 10^5 ćelija *B. cereusa* po gramu namirnice. Optimalna temperatura za rast i razvoj bakterije *B. cereus* je oko 35 °C, pa je namirnice nakon termičkog tretmana potrebno odmah konzumirati, ili ih nakon kratkog hlađenja na sobnoj temperaturi, skladištiti u frižideru. Da bi se sprečio rast i razmnožavanje bakterije *B. cereus*, namirnice je potrebno skladištiti na temperaturama $T < 5$ °C ili $T > 60$ °C. Pored alimentarnih infekcija bakterija *B. cereus* izaziva i čitav niz drugih oboljenja: septični meningitis, endokarditis, celulitis,

gangrenu i brojne respiratorne, hiruške i oftalmološke infekcije (Ginsburg i sar., 2003), koji se čak mogu zameniti sa gasnom gangrenom izazvanim drugim Gram-pozitivnim bacilima (Rosenbaum i sar., 2013). Zbog toga su nastale nove dijagnostičke metode za izolaciju, detekciju i identifikaciju sojeva *Bacillus cereus* i njegovih toksina.

Termolabilni enterotoksini bakterije *B. cereus* se unište u toku pripreme hrane na povišenoj temperaturi, ali nije poznat metod za detoksikaciju emetičnog toksina u hrani.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 *Bacillus cereus* grupa

Rod *Bacillus* je heterogena grupa Gram-pozitivnih, sporogenih bakterija, čija DNK sadrži lance G+C (Guanin+Citozin), u procentu od 37% i pripada *phylum-u* *Firmicutes* (Holt i sar., 1994). Prvi put rod *Bacillus* je opisan 1872. godine od strane Ferdinanda Kohna.

Rani pokušaji klasifikacija bakterija iz roda *Bacillus* su zasnovani na osnovu dve karakteristike: aeroban rast i formiranje endospora. Rezultat ove klasifikacije je bio da se povežu bakterije, koje imaju drugačiju fiziologiju i žive u veoma različitim životnim sredinama (Todar, 2005).

Filogenetski klasifikaciona šema identifikuje dva osnovna tipa endosporogenih bakterija. To su red *Clostridiales* i red *Bacillales* sa porodicom *Bacillaceae*.

Bakterije roda *Bacillus*, koje mogu izazvati trovanje hranom, pripadaju mezofilnim vrstama i dele se u tri grupe. U prvu grupu spadaju oportunistički patogeni, za koje je karakterističan elipsoidan ili cilindričan oblik spora. Mogu se naći i u aerobnoj i anaerobnoj sredini. Na osnovu veličine ćelija i specifičnih lipida u citoplazmi ova grupa se deli na 1A i 1B odeljak. Bakterije u grupi 1A veće su od 0,9 mikrometara i sadrže lipidne globule u citoplazmi i tu spadaju: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* i *B. anthracis*. U grupu 1B spadaju: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* i *B. coagulans*, koje su manje od 0,9 mikrometara (Todar, 2005).

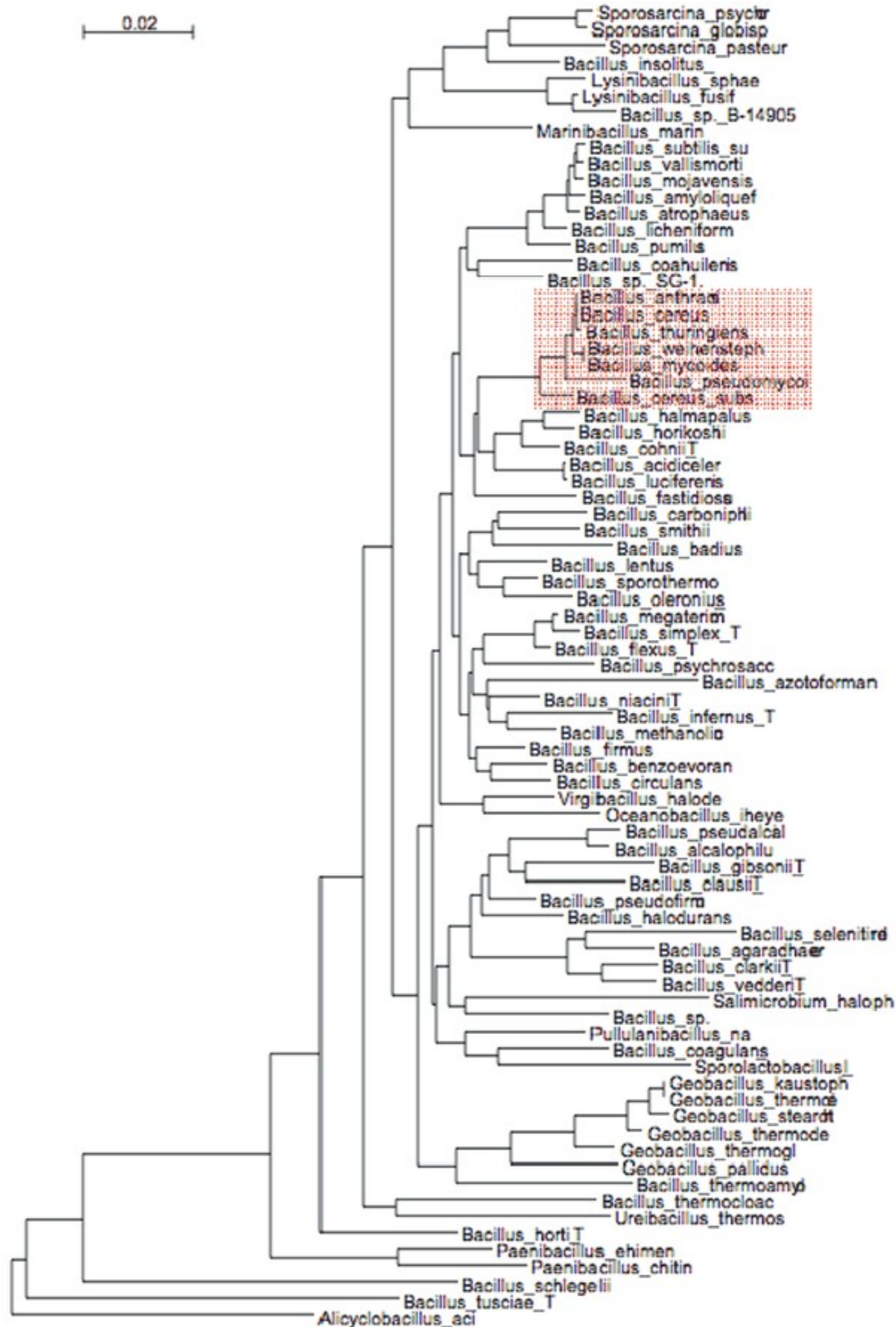
Na osnovu genetičke raznolikosti rod *Bacillus* obuhvata 60 vrsta i većina od njih je nepatogena. Na osnovu 16S rRNK filogenije ili fenotipskih karakteristika, rod *Bacillus* sadrži pet do šest grupa (Priest, 1993) (Slika 1). Prva grupa *Bacillus cereus sensu lato* obuhvata vrste: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* (Granum 2002; Jensen i sar., 2003; Ehling-Schulzi i sar., 2005a). Ovih šest bakterija i pored velike raznovrsnosti faktora virulencije imaju visoku genetsku srodnost i zbog toga pojedini autori predlažu da se ova cela grupa predstavi kao jedna vrsta. Identifikovana je grupa od tri termofilna soja (Lund i sar., 2000; Fagerlund i sar., 2007; Auger i sar., 2008), koji se predlažu kao nova vrsta: *Bacillus cytotoxicus* (ili *B. cytotoxis*) (Lapidus i sar., 2008).

Bacillus cereus sensu stricto (*B. cereus*) na osnovu flagelarnih antigena ima 42 poznata serotipa. Serotipovi 1, 3 i 8 se povezuju sa emetičnim toksinom, a serotipovi 1, 2, 6, 8, 10 i 19 sa termoosetljivim enterotokinom. Potvrđeno je da je serotip 1 najčešće prisutan kod trovanja hranom u svetu. Iako još uvek nije potvrđena genetska veza između prisusustva toksina i flagelarnih antigena Granum i Baird Parker (2000) ističu tu mogućnost.

2.2 Vrsta *Bacillus cereus*

2.2.1 Opis vrste

B. cereus je prvi put izolovan 1887. iz vazduha štale Frankland i Frankland (Roberts i sar., 1996; Forsythe, 2000; Griffiths i Schraft, 2002). Pod mikroskopom ćelije su štapićaste, prave, u prečniku obično 0.5-2.5 μm i u dužini 1.2-10 μm , često raspoređene u parovima ili lancima (Holt i sar., 1994). Ćelije se boje Gram-pozitivno, s tim što se starije kulture teže boje ljubičasto (Varnam i Evans, 1991). Pokretne su i to zahvaljujući peritrihijalnoj flageli (Varnam i Evans, 1991). U nepovoljnim uslovima *B. cereus* stvara endospore koje mogu biti centralno ili pericentralno postavljene. *B. cereus* je mezofilna, fakultativno anaerobna bakterija (Grifits i Schraft, 2002) i može da raste sa redoks- potencijalom ispod -200 mV (Varnam i Evans, 1991). *B. cereus* kao obavezne faktore rasta koristi tri L-aminokiseline: treonin, leucin, valin (Agata i sar., 1999), dok



Slika 1. Filogenetski odnosi vrsta roda *Bacillus* na osnovu genetičke raznolikosti 16S rRNA. Članovi *Bacillus cereus* grupe obeleženi su ružičastom bojom. Horizontalne linije ukazuju na genetičku udaljenost od 0.02. Preuzeto od: Økstad i Kostø, 2011.

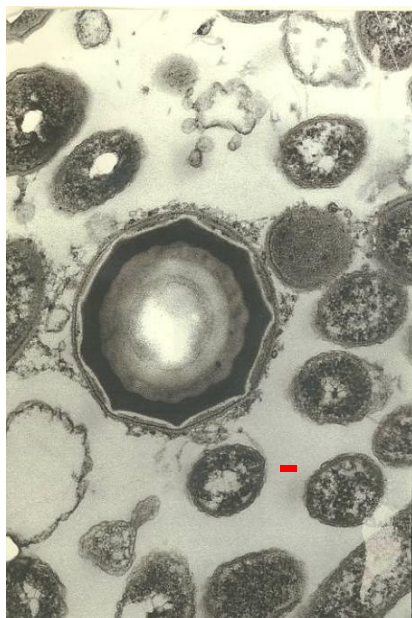
vitamini nisu obavezni (Grifits i Schraft, 2002). Temperaturni opseg rasta je od 4-55 °C (optimum 30-40 °C) (Roberts i sar., 1996). Psihrotrofni sojevi su česti i mogu da rastu na temperaturi od 4-5 °C. Prema Granum-u i Baird Parker-u (2000) minimalna količina vode (av) za rast je 0,93, a pH opseg je od 5.0-8.8, sa optimumom pH 6.0 do 7.0, dok drugi autori kao optimum pH navode vrednosti 4.3 do 9.3 i vodenom aktivnošću av od 0.92 (Väisänen i sar., 1999; Baron i sar., 1994).

2.2.2 Spore kod vrste *B. cereus*

Sve vrste roda *Bacillus* mogu formirati spore otporne na toplotu - stabilne endospore (Henrikues i Moran, 2007). Spore nemaju merljivu metaboličku aktivnost i mogu da prežive u odsustvu hranljivih materija mnogo godina. Kod vrsta *B. cereus* spore su elipsoidnog oblika i mogu biti smeštene centralno ili subterminalno. Sporulacija započinje sa nejednakom podelom citoplazme, što dovodi do stvaranja veće i manje ćerke ćelije, svake sa kompletnim genomom. Nakon serije morfoloških promena majka ćelija lizira i oslobađa spore u spoljašnju sredinu. Stvara se samo jedna spora po ćeliji (Holt i sar., 1994). Za proces formiranja spora potrebno je oko 6 h (Henrikues i Moran, 2007). Endospora je u stanju mirovanja tvrda i nereproduktivna struktura. Primarna funkcija endospore je da obezbedi opstanak bakterije u toku nepovoljnih životnih uslova u spoljašnjoj sredini. Spore su vrlo otporne na toplotu, sušenje, toksične hemikalije, UV zračenje, gama zračenje i druge štetne faktore životne sredine. Pronalazak spora na ćilibarima starim 25-40 miliona godina ili na slanim inkluzijama starim 250 miliona godina, svrstava vrste roda *Bacillus* među najotpornije bakterije (Sagripanti i sar., 2006; Henrikues i Moran, 2007).

Spore *B. cereus* imaju najhidrofobniju površinu u odnosu na bilo koju drugu vrstu iz roda *Bacillus*. Mogu preživeti na površinama kao što su čelik i plastika i teško ih je ukloniti tokom čišćenja (Granum 2002, 2007). Studije su otkrile da se spore mogu održavati na Caco-2 ćelijama u kulturi, što ukazuje da one mogu preživeti u intestinalniom epitelu (Granum, 2007). Spore nekih *B. cereus* sojeva su otpornije na toplotu u odnosu na mezofilne sojeve roda *Bacillus* kao što su *B. subtilis* i *B.*

licheniformis (Carlin i sar., 2006). One su u stanju da prežive i procedure pripreme hrane na najvišim temperaturama (Shinagawa i sar., 1996). Carlin i sar. (2006) potvrđuju u svom radu toleranciju spora na toplotu kod 17 sojeva *B. cereus* koji proizvode emetični toksin i da je otpornost na visoku temperaturu jače izražena nego kod 83 soja koji ga ne proizvode. Ova statistički značajna razlika u toleranciji na toplotu ukazuje na prisustvo težih simptoma bolesti koje izazivaju emetični sojevi, nakon konzumiranja termički obrađenih sojeva i njihovo uništavanje je veoma teško.



Slika 2. Sporulišuća kultura emetičnog *B. cereus* soja (F4810/72), transmisiona elektronska mikroskopija. Kultivacija od deset dana na Trypton soja agaru. Bar, 80 nm. Preuzeto od: Andersson i sar., 2007.

Pošto su spore metabolički neaktivne, one moraju da se vrata u aktivni oblik kroz proces klijanja. Klijanje se sastoji od niza degenerativnih događaja, tokom kojih prvo dolazi do uklanjanja barijera i klijanja endospore. Dolazi do rehidracije jezgra, olakšavajući ulazak molekula iz spoljašnje sredine (Cronin i Wilkinson, 2007; Henrikues i Moran, 2007). Među glavne indikatore klijanja spora spadaju pojava aminokiselina inozina (Yousten, 1975; Hornstra i sar., 2007), glicina i drugih neutralnih L-aminokiselina, kao i ribozida purina u citoplazmi (Warren i Gould, 1968; Griffiths i Schraft 2002; Hornstra i sar., 2006). L-alanin je najefikasnija aminokiselina koja stimuliše klijanje, tako što dovodi do hidracije spora, gubitka jona kalcijuma i

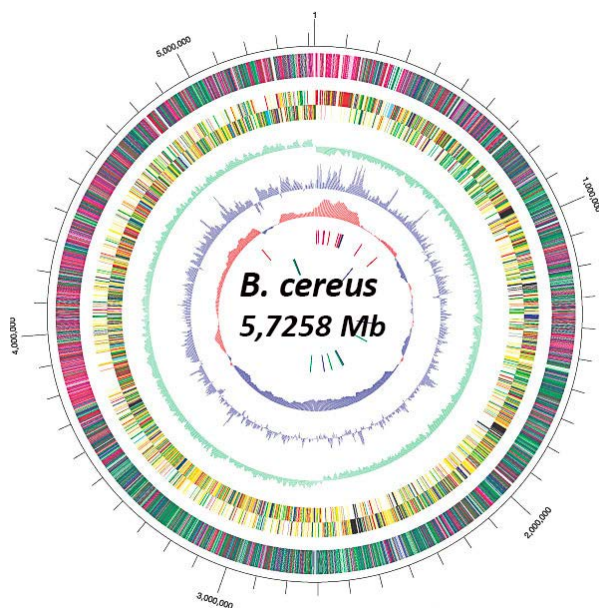
dipikolinske kiseline (Yousten, 1975; Griffiths i Schraft 2002; Hornstra i sar., 2007). Proces germinacije odvija se na temperaturi od 8-30 °C (Slika 2).

2.2.3 Genom vrste *B. cereus*

Genetski materijal bakterije *B. cereus* je organizovan u velikom cirkularnom hromozomu i plazmidima. Kod pojedinih izolata postoje razlike u veličini genoma, pa srednja ukupna dužina genoma bakterije *B. cereus* iznosi 5,7258 Mb (mega baza), a srednji G+C sadržaj je 35,2% (NCBI, 2008) (Slika 3). Ovi podaci dobijeni su sekvenciranjem genoma, a prvi genom iz grupe *B. cereus* koji je sekvenciran bio je soj *B. anthracis* Ames. Realizacija ovog projekta započela je 2000. godine, a nakon bioterorističkog napada preko pisama kontaminiranih sporama *B. anthracis* tokom 2001. godine, intenzivirano je sekvenciranje brojnih sojeva *B. cereus* grupe. Prvi sekvencirani soj *B. cereus* bio je ATCC 14579. Njegov genom je imao 5,41 Mb, GC sadržaj je bio 35,3%, a broj gena 5473. Tipično za sojeve grupe *B. cereus* je da nose veliki broj operona za rRNK, kojih u hromozomu *B. anthracis* Ames ima jedanaest, a u hromozomu *B. cereus* ATCC 14579 trinaest (Økstad i Kolstø, 2011).

B. cereus može sadržati različit broj plazmida, čija veličina varira od 5-500 kb (kilo baza). Samo neki od njih povezani su sa patogeneзом, pa njihova detekcija omogućava razvrstavanje sojeva na patogene i nepatogene. Tako je potvrđeno, da sojevi *B. anthracis* imaju karakteristične plazmide pXO1 i pXO2, čije prisustvo uslovljava virulenciju ove vrste. Plazmid pXO1 se može naći i kod sojeva vrste *B. cereus*, ali je avirulentan jer ne sadrži deo koji kodira toksin i regulatorne proteine. Međutim, za potpunu virulenciju neophodan je i pXO2 plazmid koji kodira gene neophodne za biosintezu kapsule (Rasko i sar., 2005). Komparativna analiza genoma sojeva grupe *B. cereus* potvrdila je, da bez obzira na razlike koje mogu postojati između njihovih hromozoma, glavne razlike u patogenosti su uslovljene genima koji se nalaze na plazmidima. Nepatogeni sojevi *B. cereus* razlikuju se od patogenih sojeva *B. anthracis* samo po tome što im nedostaje "ostrvo patogenosti" koje sadrži različite gene neophodne za sintezu toksina (Primrose i Twyman 2006).

U genomu *B. cereus* može biti integrisano više profaga, a linearni elementi slični fagu mogu postojati kao vanhromozomski (Økstad i Kolstø, 2011). Nije pokazano da oni sadrže neki gen koji bi kodirao toksin, ali mogu biti važan izvor razmene gena između bakterija.



Slika 3. Genom *B. cereus*. Prema: Ivanova i sar., 2003.

2.2.4 Kultivacija i identifikacija vrste *B. cereus*

Primarno zasejavanje uzorka sa sumnjom na prisustvo *B. cereus* bez obzira na njegovo poreklo, započinje zasejavanjem na hranljivu podlogu obogaćenu ovčijom krvi (5%). Porast kolonija i prisustvo beta hemolize izdvaja *B. cereus* od *B. anthracis*, ali ne i od nekih drugih vrsta roda *Bacillus* (Tabela 1). Zbog toga je neophodno raditi dalju identifikaciju. Do danas su napravljene dve selektivne podloge, čija je selektivnost u direktnoj vezi sa sposobnošću *B. cereus* da hidrolizuje lecitin i nemogućnošću da fermentiše manitol: Polymyxin-egg yolk-mannitol-bromothymol blue (PEMBA) i manitol-egg yolk-polymyxin agar (MYP). Selektivnost podlozi daju manitol, žumance jajeta i polimiksin.

Polimixin B ima ulogu da sprečava rast Gram-negativnih bakterija. Kao indikator fermentacije manitola dodaje se fenol crveno, koji daje boju kolonijama soja *B. cereus* (kolonije su ružičaste), za razliku od drugih pripadnika roda *Bacillus* kod kojih dolazi do fermentacije manitola u kiselinu, izazivajući promenu pH sredine, pa su kolonije tih vrsta žute boje. Prisustvo žumanceta omogućuje proizvodnju zone oko kolonija sa lecitinaznom aktivnošću, kao što je slučaj za većinu sojeva *B. cereus*. Aktivnost lecitinaze i negativna reakcija za fermentaciju manitola su najtipičnije karakteristike sojeva *B. cereus* i osnova za njihovu identifikaciju (Granum i Baird - Parker, 2000).

Ove podloge preporučene su za identifikaciju i brojanje kolonija bakterije *B. cereus* prilikom ispitivanja uzoraka hrane, od strane Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), Nordic Committee and Food Analysis (NMKL, 1997), Food and Drug Administration (FDA, 1998) i Dairy Federation (IDF, 1998) (Jääskeläinen, 2008).

Tabela 1. Kriterijumi za razlikovanje među članovima *B. cereus* grupe

(Prema: Jääskeläinen, 2008)

Vrsta	Pokretljivost	Osetljivost na penicilin	Fermentacija manitola	Hemoliza	Parasporalne kristalne inkluzije
<i>B. cereus</i>	+/-	-	-	+	-
<i>B. anthracis</i>	-	+	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	+/-	-	-	+	+
<i>B. mycoides</i>	-	-	-	+	-
<i>B. pseudomycoides</i>	-	n.d	-	n.d	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	+/-	-	-	+	-

n.d. = nije utvrđeno

B. weihenstephanensis se razlikuje od *B. cereus* na osnovu temperature rasta, jer može da raste ne nižoj od 7°C i ne iznad 43°C. *B. pseudomycoides* se ne razlikuje od *B. mycoides* po fiziološkim ili morfološkim karakteristikama, ali se razlikuje prema sastavu masnih kiselina i sekvenci gena 16S rRNA.

Najveću sličnost sa *B. cereus* ima *B. thuringiensis*. Čak ni metodom sekvenciranja nije utvrđena razlika među njima. Do skora se prisustvo *cry* gena vezivalo za vrstu *B. thuringiensis*, ali novija istraživanja potvrdila su njegovo prisustvo i kod vrsta *B. cereus*, s tim što kod njih ne dolazi do stvaranja intracelularnih protein kristala u toku sporulacije (Kolstø i sar., 2002), što omogućava razlikovanje ove dve genetski srodne vrste.

Pored izolacije na podlogama, za kompletniju identifikaciju koriste se i druge biohemijske osobine *B. cereus*, kao što su fermentacija glukoze, pozitivna reakcija Voges-Proskauer, redukcija nitrata. Postoje komercijalno napravljeni biohemijski testovi kao što su API (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, France) i BBL Crystal (Becton, Dickinson and Company, USA). Testovi su jednostavni za izvođenje, očitavaju se vizuelno ili automatski na osnovu kodova proizvođača i za njih možemo reći da su specifičniji i osetljiviji u odnosu na pomenute podloge koje se kod uzoraka od pacijenata mogu koristiti samo kao skrining.

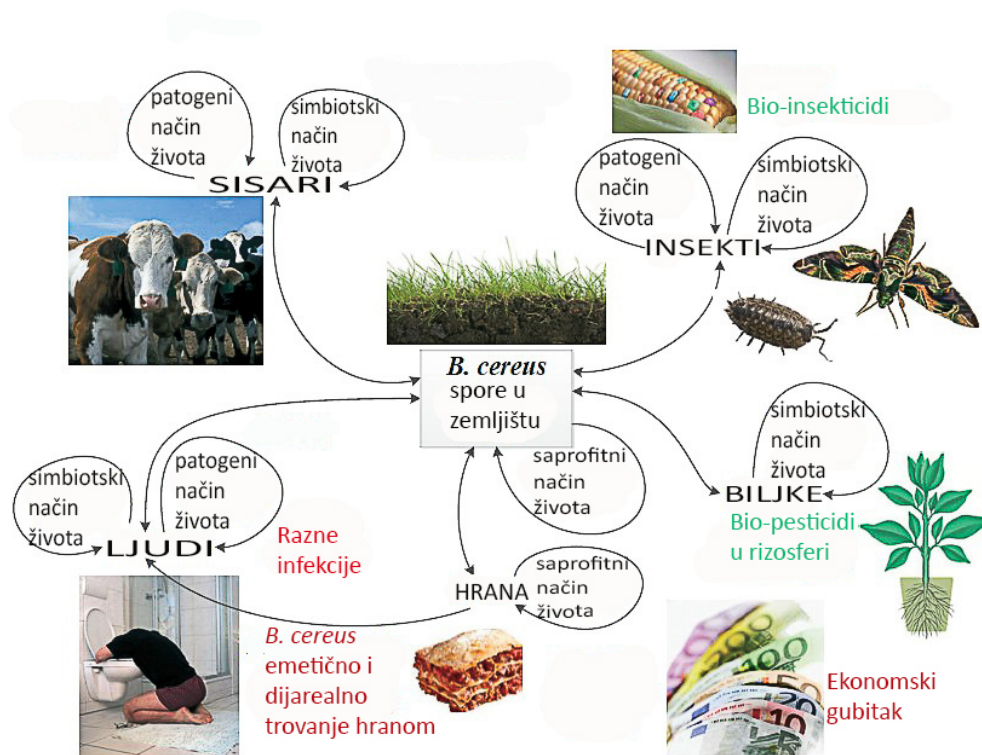
U poslednjim decenijama sa napretkom molekularne biologije i sekvenciranja genoma svih organizama, pa i *B. cereus*, detekcija i identifikacija ove vrste je još specifičnija, senzitivnija i brža. Međutim, usled visokog stepena sličnosti genoma među sojevima *Bacillus cereus* grupe, PCR metodom se potvrđuje pripadanost grupi, na osnovu specifičnih prajmera za nju. Značaj PCR metode je u detekciji gena za produkciju emetičnog i entero toksina, kao potencijalnih izazivača toksikoinfekcije kod ljudi. Njena velika prednost je u brzini dobijanja rezultata (u roku od nekoliko sati), za razliku od klasičnih metoda kultivacije i identifikacije za koje je potrebno najmanje tri dana. Sa uvođenjem metode sekvenciranja, metodologija se još više usavršava tako da su do danas dešifrovani genomi mnogih vrsta *B. cereus* grupe u celosti i utvrđena je razlika među njima.

2.2.5 *B. cereus* u okruženju i u hrani

Vrste koje pripadaju rodu *Bacillus* su aerobni i fakultativno anaerobni, Gram-pozitivni, spirogeni štapići. Raspostranjeni su u širokom spektru staništa: zemlji, vodi, vazduhu, hrani, kao i u fekalijama ljudi i životinja (Beattie i Villiams, 2000).

U svim navedenim staništima mogu se naći i sojevi *B. cereus*, međutim smatra se da je najverovatnije njihovo primarno stanište u crevima artropodnih beskičmenjaka (insekata) (Jensen i sar., 2003; Swiecicka i Mahillon, 2006.), ali u velikom procentu može se izolovati i iz interstinuma (stomaka) malih divljih sisara, uključujući glodare i insektivore (Swiecicka i Mahillon, 2006).

Nakon izbacivanja u spoljašnju sredinu vegetativne ćelije ili spore bakterije *B. cereus* ulaze u lanac ishrane, kružeći od zemljišta do biljaka, životinja i čoveka, dovodeći do velikog problema u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, kao i u veterinarskoj i humanoj medicini (Guinebretičre i sar., 2006) (Slika 4).



Slika 4. Kruženje bakterije *B. cereus* u prirodi. Prema: Ceuppens i sar., 2013.

Otpornost spora na visoku temperature omogućuje vrsti *B. cereus* da preživi i nakon termičke obrade hrane i na taj način dovede do toksikoinfekcije kod ljudi i životinja usled produkcije dijarejnog i emetičnog toksina. Međutim, prisustvo

termostabilnog emetičnog toksina – cereulida u kuvanoj hrani i njegovo unošenje u organizam dovodi i do alimentarnih intoksikacija.

B. cereus je izolovan iz praktično svih nesterilnih uzoraka hrane (Kolstø i sar., 2002, Granum, 2007), a ispitivano je i nekoliko različitih staništa na prisustvo tj. produkciju toksina. Tom prilikom konstantovano je da samo nekoliko sojeva *B. cereus* proizvode ovaj toksin (Jääskeläinen, 2008).

2.3 Trovanje bakterijom *B. cereus* iz hrane

U okviru evropskog zakonodavstva *B. cereus* je klasifikovan u grupu organizama drugog stepena opasnosti, na osnovu svojih sposobnosti da izazove infekcija kod ljudi (Evropska komisija, 1993). Prema izveštaju European Food Safety Authority (EFSA) od svih epidemija nastalih unosom neispravne hrane, *B. cereus* je bio odgovoran za 1,88% u 2010. godini (EFSA, 2012). Zbog malog broja slučajeva *B. cereus* je potcenjivan u odnosu na druge patogene koji se unose hranom. Kao razlog za to Ceuppens i dr. (2013) navode četiri razloga. Prvo, nedovoljan broj prijavljivanja, usled blagih i prolaznih simptoma bolesti. Drugo, *B. cereus* nije klasifikovan u zoonoze, bolesti koje prenose životinje, i zbog toga dobija manje pažnje u izveštavanju. Treće, atipične i emetične vrste, koje su često bez ili sa malo lecitinazne i hemolitičke aktivnosti, nisu detektovane sa standardnim brojanjem kolonija *B. cereus* na MYP hranljivoj podlozi, preporučene od strane ISO7932:2004. I na kraju kao četvrto ističe se, da su često u kombinaciji više vrsta *B. cereus* koje učestvuju kao uzročnici bolesti i zbog toga sugerišu da bi njihove kolonije trebalo selektovati za dalje istraživanje i uporediti sa izolatima iz stolice pacijenata ili sadržajem nakon povraćanja.

Prvi put kao izazivač trovanja *B. cereus* je dokazan 1950. godine kao uzročnik bolesti nastale nakon unosa hrane, jer je potvrđeno da je sos od vanile bio zagađen, što je rezultiralo dijarejom (Jay i sar., 2005). 1971. godine utvrđeno je da je kod osoba koje su konzumirale kuvani pirinač u kineskim restoranima, došlo do gastrointestinalnih tegoba i da je uzročnik *B. cereus* koji luči termostabilni emetični toksin (Mortimer i McCann, 1974). Nakon toga, istaknuto je da *B. cereus* može biti značajan uzročnik trovanja hranom širom sveta, usled lučenja dijarealnog i emetičnog toksina. U toku 2005. godine u

Finskoj je utvrđeno da su od ukupno 55 epidemija trovanja hranom ili vodom za piće, sve bile izazvane bakterijom *B. cereus* (Niskanen i sar., 2006). Niskanen i sar. (2007) su utvrdili i da u pet epidemija (10%) u kojim je obolelo 64 osobe uzročnik bio *B. cereus*, ali u devetnaest epidemija (38%) uzrok obolevanja nije pronađen. Prisustvo *B. cereus* u konvencionalnoj hrani i katering u mnogim evropskim zemljama (Guinebretičre i sar., 2002, 2006; Wijnands i sar., 2006) izazvao je veliki problem. Pored toga, *B. cereus* može biti uzročnik epidemija nakon konzumiranja podgrejane hrane zbog prelaza spora u vegetativnu formu. Često se stepen bolesti izazvane *B. cereus* podcenjuje zbog obično kratkog vremena trajanja simptoma (često < 24h) i kod dijarealnog i emetičnog sindroma (Granum 2007). Zbog toga je pun obim trovanja bakterijom *B. cereus* iz hrane još nepoznat. Epidemije koje se pripisuju *B. cereus* iz hrane u Severnoj Americi, Evropi i Japanu kreću se u rasponu od 1% do 22% slučajaja (Grifits i Schraft 2002). Holandija i Norveška su prijavile da imaju najviše problema zbog prisustva *B. cereus* u odnosu na druge bakterije koje se mogu naći u hrani (Griffiths i Schraft 2002). U Japanu su za oko 10 puta češće prijavljeni slučajevi obolevanja usled prisustva emetičnog toksina, nego od dijarealne bolesti, dok je u Evropi obrnut slučaj. Smatra se da je uzrok ove razlike verovatno zbog vrste hrane i njene tradicionalne pripreme u ovim oblastima (Granum, 2007).

2.3.1 Intoksikacija dijarejalnim toksinom bakterije *B. cereus*

Unošenjem bakterija *B. cereus* ili njihovih spora javlja se bol u stomaku i dijareja. Period inkubacije je 8-16 h i simptomi traju 12-24 h (Sim, 1998; Beattie i Vilijams, 2000; Granum 2007). Uzrok nastanka sindroma dijareje tj. pojave više od tri tečne ili vodenaste stolice u toku 24 časa prouzrokovano je lučenjem jednog do tri dijarejalna enterotoksina: haemolizina (Hbl), nehemolitičnog enterotoksina (Nhe), citotoksina K (citK - 1 i citK - 2) (Fagerlund i sar. 2004), a po drugima verovatno i enterotoksina T i enterotoksin FM (Guinebretičre i sar. 2002; Taylor i sar., 2005; Moravek i sar., 2006). Svi enterotoksini kodirani su genima koji se nalaze na hromozomu, a njihovu sintezu reguliše ekstracelularni faktor virulencije PlcR (Gohar i sar., 2008; Kolstø i sar., 2009). Kod

većine sojeva *B. cereus* i *B. thuringiensis* PlcR je aktivan i bitan za ekspresiju više faktora virulencije, ali nije neophodan za ispoljavanja virulencije kod *B. anthracis*.

Većina enterotoksina se formira tokom kasne eksponencijalne ili početkom stacionarne faze, na optimalnoj temperaturi od 32-37 °C i pH 7.5. Međutim, neki od sojeva *B. cereus* stvaraju enterotoksine čak i na temperaturama nižim od 15 °C (McKillip, 2000). Prilikom zagrevanja hrane 5 minuta na 56 °C enterotoksini gube aktivnost. Takođe, oni su osetljivi na neke od proteaza, naročito na enzim tripsin i pepsin (Granum i Nissen, 1993). Formiranje enterotoksina pored vrednosti temperature i pH, zavisi i od tipa medijuma, količine kiseonika i prisustva određenih ugljenih hidrata. Tako, na primer kod sojeva koji su inkubirani na istoj temperaturi, ali sa različitom količinom kiseonika, došlo je do razlike u produkciji hemolitičnog enterotoksin, a McKillip (2000) ističe razliku u formiranju enterotoksina usled različite količine skroba i glukoze u podlozi.

Trovanja dijarejalnim enterotoksinima bakterija *B. cereus* može da izazove hrana koja sadrži od 200 do 10^9 bakterija po gramu (Palman, 2006). Lund i Granum (1997) napominju da namirnice koje sadrže više od 10^3 bakterije *B. cereus*/g, ne mogu bezbedno da se jedu. Ceuppens i sar. (2013) navode da je teško identifikovati tačnu infektivnu dozu kod dijarejalnog trovanja hranom, zbog izuzetno velike varijabilnosti sojeva *B. cereus*, fiziologije domaćina i vrste hrane, što sve utiče na pojavu i težinu oboljenja.

U gastrointestinalnom traktu proteolitički enzimi i povišena vrednost pH vari ove enterotoksine ako su prisutni u hrani. Međutim, spore *B. cereus* prežive varenje i mogu klijati u tankom crevu (Jensen i sar., 2003; Swiecicka i sar., 2006; Granum, 2007), tako da novostvorene vegetativne ćelije u određenom trenutku mogu da produkuju enterotoksine.

Hemolitički enterotoksin (Hbl) se sastoji od tri komponente: B, L1 i L2. HBL deluje na razaranje eritrocita, leukocita i makrofaga, tkiva kože i utiče na propustljivost vaskularnog sistema. Enterotoksin Hbl je zbog ovih karakteristika, glavni faktor virulentnosti kod dijarejalnog sindroma. Zaključeno je da su za toksična dejstva HBL neophodne sve tri komponente. Dok komponenta B služi za vezivanje na površinu ciljne ćelije, dve komponente L izazivaju lizu target ćelije. Međutim, moguć je i drugačiji mehanizam delovanja Hbl, tako što se Hbl komponente vezuju za ciljne ćelije nezavisno i

tek nakon toga dolazi do uspostavljanja kompleksa koji će dovesti do lize ćelije (Granum i Lund, 1997; McKillip, 2000; Lindback i sar., 2004). Sve tri komponente kodirane su *hbIC*, *hbID* i *hbIA* genima smeštenim na hromozomu. *Hbl* lokus je manje prisutan u *B. cereus* grupi u odnosu na *nhe* lokus i detektovan je u oko 60% vrsta koristeći PCR skrining proceduru (Prüss i sar., 1999).

Prisustvo nehemolitičnih enterotoksina (Nhe), je utvrđeno i okarakterisano prateći veliko trovanje hranom u Norveškoj 1995. godine (Lund i Granum, 1996). Kompleks je kodiran sa tri gena *nheA*, *nheB* i *nheC* genima smeštenim na hromozomu (Fagerlund i sar., 2008).

Enterotoksin - citotoksin K (CytK) je protein koji se sastoji od jednog polipeptidnog lanca, veličine 34 kDa (Fagerlund i sar., 2004) i dovodi do nekrotičnih, hemolitičnih i citotoksičnih promena ćelija crevnog epitela, a sa tim izaziva dijarejalni sindrom. Prvi put je izolovan iz *B. cereus* sojeva koji su izazvali ozbiljna trovanja hranom kod više ljudi, od kojih je troje starijih umrlo. Ovi sojevi nisu imali ni jedan drugi gen za kodiranje drugih enterotoksina osim za Cyt K (Lund i sar., 2000).

Za detekciju lučenja enterotoksina koriste se komercijalni imunološki testovi koji su dostupni na tržištu. BCET - RPLA: *Bacillus cereus* enterotoksin - reverzna pasivna lateks aglutinacija (Okoid, Basingstok, Velika Britanija), koja detektuje L2 komponentu hemolizina (Granum, 2002). Tecra (BDE - VIA, Batlei, Velika Britanija) je omogućio detekciju dve proteinske komponente nehemolitičnog enterotoksina bakterije *B. cereus* (Lund i Granum, 1996). Test BCET - RPLA detektuje prisustvo toksina pri koncentraciji od 2 ng/ml, a test BDE - VIA registruje Nhe toksin u koncentraciji od 1ng/ml i ne otkriva toksin Hbl (Beecher i Wong, 1994; Godić Torkar i Smole Možina, 2001). Nasuprot njima Duapth *Cereus* Enterotoxins (Merck, Namačka) test je imunohromatografski test koji ima mogućnost detekcije dva enterotoksina nehemolitičnog (Nhe), ali i hemolitičnog (Hbl) enterotoksina iz uzoraka hrane.

Testovi su veoma specifični i osetljivi i mogu se koristiti u rutinskoj dijagnostici crevnih infekcija sa simptomima dejareje.

Praćenje prisustva citopatogenog efekta na kulturi tkiva usled prisustva enterotoksina, zauzima posebno mesto u dijagnostici, jer ovom metodom se detektuje produkcija toksina, a ne samo njegovo prisustvo. Najčešće testiranje se radi na Vero

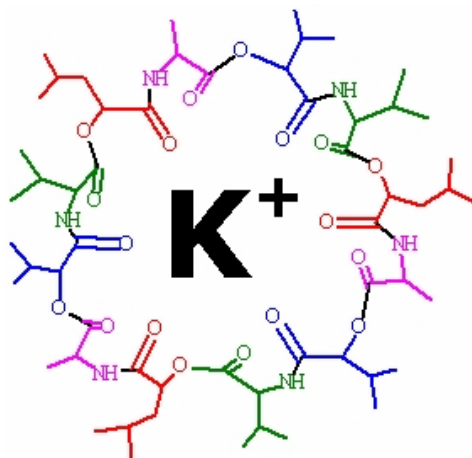
(tumorska ćelijska linija bubrega majmuna) i CHO (tumorska ćelijska linija jajnika kineskog hrčka) ćelijskim linijama (Jääskeläinen, 2008).

Prisustvo gena za enterotoksine koji dovodi do dijareje mogu se detektovati korišćenjem metode za umnožavanje gena PCR (Guinebretičre i sar., 2002, 2006; Abriouel i sar., 2007; Fagerlund i sar. 2007; Senesi i Ghelardi, 2010; Nooratiny i Sahilah, 2013). Ovi testovi su najosetljiviji, jer detektujemo specifičnu sekvencu za sve vrste enterotoksina (Hbl, Nhe, citK - 1 i citK - 2, enterotoksin T, enterotoksin FM), čije prisustvo može da se poveže sa simptomima dijareje, ako se testira uzorak stolice pacijenata. Kako se enterotoksini uništavaju u procesu termičke obrade hrane ili usled prolaska kroz kiselu sredinu želuca, do stvaranja enterotoksina dolazi tek nakon klijanja spora u tankom crevu domaćina. Wijnands i dr. (2007) su pokazali da dolazi do indukovane germinacije spora *B. cereus* na diferenciranim Caco - 2 ćelijama. Međutim, samo detekovanje gena ne znači i obavezno prisustvo simptoma intoksikacije, već samo ukazuje na potencijalnu mogućnost obolevanja.

2.3.2 Intoksikacija emetičnim toksinom bakterije *B. cereus*

Emetični (cereulidni) toksin je mali neribozomalno sintetisan prstenasti dodekadepsi-peptid, veličine 1.2 kDa (Agata i sar. 1994) (Slika 5). Sinteza cereulida je kodirana sa 24 kb grupom gena (*ces*), koji se nalaze na 208 kb plazmidu-pCER270 (Ehling-Schulz i sar., 2006; Rasko i sar., 2007). Klaster sadrži sedam gena, uključujući tipične gene za neribozomalnu peptid sintetazu (NRPS), kao i fosfopantetenilnu transferazu i gene koji kodiraju aktivnost i inkorporaciju monomera u peptidne lance.

Emetični toksin se sastoji od 2 aminokiseline i 2 hidroksi kiseline, koje se ponavljaju tri puta: D-O-leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val. Strukturno podseća na valinomycin proizveden u sojevima *Streptomyces griseus* (Agata i sar., 1994; 1995). I cereulid i valinomycin su kalijum jonofore (Mikkola i sar., 1999; Teplova i sar., 2006; Andersson i sar., 2007). Cereulid je otporan na toplotu, ekstremne pH vrednost (od pH2 – pH9) i proteolitičke aktivnosti pepsina i tripsina (Kramer i Gilbert, 1989). Unešen hranaom toksin ostaje netaknut i tek u inerinu zadobija infektivnu formu (aktivnan toksičan oblik).



Slika 5. Struktura emetičnog toksina. Preuzeto od: Jääskeläinen, 2008.

Smatra se da je emetični toksin zajedno sa citotoksinom K (Lund i sar., 2000), jedan od naopasnijih toksina proizvedenih od strane sojeva *B. cereus*. Iznenadna smrt zdravih mladih ljudi pripisuje se intoksikaciji sa emetičnim toksinom sojeva *B. cereus*, što potvrđuju slučajevi trovanja hranom sedmogodišnje devojčice iz Belgije i sedamnaestogodišnjeg dečak iz Švajcarske (Mahler i sar., 1997; Dierick i sar., 2005). U oba slučaja deca su jela testeninu koja je spremljena par dana ranije. Interesantno je da dečak nije imao karakteristične simptome za trovanje emetičnim toksinom kao što je povraćanje, a devojčica jeste. Međutim, u oba slučaja došlo je do oštećenja funkcije jetre, sa dodatnim komplikacijama koji su doveli do smrti dece. Autopsija je utvrdila visoku koncentraciju emetičnog toksina bakterije *B. cereus*, kako u uzorcima jetre, tako i u uzorcima hrane.

Najviše cereulida se formira na početku stacionarne faze rasta *B. cereus*. Količina cereulida proizvedena od strane bakterija zavisi od temperature inkubacije, medijuma za rast, pH vrednosti, prisustva kiseonika i specifičnih aminokiselina. Prisustvo glukoze verovatno podstiče njegovu proizvodnju, a negativan efekat na proizvodnju imaju višak snabdevanje leucinom, izoleucinom i glutaminskom kiselinom u medijumu (Ehling - Schulz i sar., 2004b). Najveću produkciju emetičnog toksina imaju sojevi *B. cereus* u namirnicama kao što su: pirinač i testenina, nešto manje hleb i poslastice (Shinagawa,

1990; Leuschner, 2003; Granum i Baird - Parker, 2000). Potvrđeno je veće prisustvo cereulida u mleku u prahu i mlečnim proizvodima za odojčad, nego u pirinču (Holmes i sar, 1981; Ehling - Schulz, 2004b; Shaheen i sar., 2006). Mlečni proizvodi imaju odgovarajuću strukturu (zrna i hranljivih materija), koja snažno podstiče formiranje cereulida (Shaheen i sar., 2006). Duc i sar. (2005) navode primer tri bebe koje su jele hranu za bebe i obolele. Rast *B. cereus* i formiranje emetičnog toksina se zaustavlja kada se u jela doda sirće, majonez i sos od paradajza, verovatno zbog niže pH vrednosti (Agata i sar., 2002)

Toksin prisutan u hrani može da izazove simptome već nakon pola sata do pet sati od konzumiranja hrane. Bolest se karakteriše mučninom i povraćanjem, u trajanju od 6-24 h. Emetični toksin deluje na 5-HT₃ (serotonin) receptore aferentnih nervnih vlakana, inhibirajući ih. Presecanjem ovog nerva kod insektivore, azijske kućne rovčice (*Suncus murinus*) dolazi do izostanka imunog odgovora na unos cereulide (Agata i sar., 1995). Zna se da cereulidi inhibiraju proizvodnju citokina, a sa tim ispoljava se njihov potencijal imunosupresora (Paananen i sar., 2002; Ehling - Schulz i sar., 2004b).

Povraćanje kao simptom intoksikacije emetičnim sojevima *B. cereus* potvrđeno je nakon indukovano povraćanja kod rezus majmuna (*Macaca mulatta*) i azijske kućne rovčice. Pokazano je da miševi nisu osetljivi na oralno davanje sintetičkih cereulida, ali kada se cereulid ubrizga intraperitonealno dolazi do vakuolizacije i mitohondrijalnog otoka u jetri (Yokoyam i sar., 1999), slično tome dešava se i kod ljudi (Mahler i sar., 1997). U hepatocitama dolazi do oticanja mitohondrija, gubitka krista u mitohondrijama i dozno zavisnog povećanja malih masnih kapljica u citoplazmi. Sa povećanjem doze cereulida oštećenje hepatocita je veće, tj. degeneracija hepatocita kod miša je veća. Do regeneracije hepatocita dolazi četiri nedelje nakon izlaganja dozi cereulida od 10 µg po mišu, a povećanjem doze na 25 µg cereulida po mišu, dolazi do uginuća miševa nekoliko sati nakon primene toksina.

2.3.3 Sojevi *B. cereus* koji produkuju emetični toksin

Proučavajući fenotipske osobine vrsta roda *Bacillus*, Shinagawa (1993), Agata i sar. (1996) i Nishikava i sar. (1996) su zaključili da je proizvodnja emetičnog toksina

direktno povezana sa određenom osobinom, svojstvenom za tu vrstu, a što potvrđuju hemotaksonomske analize i genska tipizacija za određene osobine (Pirttijärvi i sar., 1999; Ehling - Schulz i sar., 2005b). Sve ove analize su jasno pokazale da postoji široka raznovrsnost sojeva koji produkuju cereulide (Apetroaie i sar., 2005; Vassileva i sar., 2007). Nemogućnost da fermentišu salicin i hidrolizuju skrob su osobine karakteristične za skoro sve emetogene sojeve *B. cereus* (Shinagawa, 1993; Agata i sar., 1996), ali ima i izuzetaka.

Većina emetičnih sojeva pripada serotipu H1, međutim, neki sojevi pripadaju serotipovima H3 i H12 (Taylor i Gilbert, 1975; Hughes i sar., 1988; Agata i sar., 1996; Vassileva i sar., 2007). Većina sojeva *B. cereus* koji produkuju emetični toksin proučavanih do 2000. godine poseduje identični profil dobijen ribotipizacijom (Pirttijärvi i sar., 1999; 2000), međutim, Apetroaie i sar. (2005) i Shaheen i sar. (2006) prikazali su da postoje sojevi sa novim profilima.

2.3.4 Metode za detekciju i kvantifikaciju emetičnog toksina kod vrste *B. cereus*

Kako po evropskom zakonodavstvu (Registracija, Evaluacija, Autorizacija i restrikcija hemikalija, REACH), koji je stupio na snagu 1. juna 2007. godine, nije dozvoljeno *in vivo* ispitivanje hrane na životinjama, testiranje prisustva toksina u hrani u *in vitro* uslovima, zauzelo je značajno mesto, posebno sa porastom broja alimentarnih intoksikacije.

Za razliku od enterotoksina za koje su proizvedeni brzi testovi za detekciju pojedinih toksina, za emetični toksin za sada nije pronađen odgovarajući test, jer se radi o malom peptidu u odnosu na proteine enterotoksina.

Praćenje vakuolarizacije mitohondrija u ćelijama Hep-2 (humanog karcinoma larinksa) usled dejstva emetičnog toksina, pomoću svetlosnog mikroskopa jedan je od najstarijih testova (Hughes i sar., 1988). Međutim, ovaj metod je teško koristiti za rutinsku upotrebu, jer je potrebno duže vremena za prekultivaciju i pripremu uzorka. Finlay i sar. (1999) su modifikovali ovaj test koristeći 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT), koji detektuje mitohondrijalnu dehidrogenazu, i time učinio ovaj test još osetljivijim, jer pokazuje vitalnost ćelija.

Anderson i sar. (1998) su napravili test na osnovu pokretljivosti spermatozoida svinja koje se koriste za priplod. Plazma membrana spermatozoida svinja ima nizak sadržaj sterola, pa je stoga veoma propustljiva za hidrofobne molekula, kao što su cereulidi. Kao posledica dejstva toksina, dolazi do oštećenja mitohondrija spermatozoida, čime je onemogućeno njihovo pokretanje. Inhibicija motiliteta može se posmatrati pomoću svetlosnog mikroskopa ili korišćenjem komercijalno dostupnog spermo analizatora (Rajkovic i sar., 2006b).

Zbog lakog rastvaranja u organskim rastvaračima, emetični toksin se može identifikovati i kvantifikovati pomoću tečne hromatografije (HPLC) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS) (Hägglom i sar., 2002). Kako prečišćeni emetični toksin nije komercijalno dostupan za upotrebu, kao standard tj. pozitivna kontrola u HPLC koristi se valinomycin, jer dovode do sličnih promena u toku testiranja.

Metod PCR je jedan od najspecifičnijih metoda za detekciju i identifikaciju gena za detekciju cereulida sojeva *B. cereus* (Ehling - Schulz i sar., 2004; Horwood i sar., 2004; Fricker i sar., 2007). Kako se rezultati testa mogu dobiti u roku od nekoliko sati, PCR metoda je zauzela vodeće mesto u dijagnostici gena za sintezu emetičnog toksina. Međutim, prisustvo samog gena ne pokazuje da li bakterija zaista proizvodi cereulide u koncentraciji dovoljnoj da uzrokuju bolest. Zbog toga, samo prisustvo gena za produkciju toksina cereulida tj. njegova učestalost, može da ukaže samo na procenu rizika, ako je toksin iz hrane, ili određen stepen verovatnoće formiranja toksina u hrani ili crevima (Apetroaie i sar., 2005; Shaheen i sar., 2006).

2.3.5 Produkcija emetičnog toksina u različitim uslovima

Devedesetih godina prošlog veka razvili su se mnogi mediji za praćenje produkcije emetičnog toksina bakterije *B. cereus*. 1991. godine Szabo i dr. su utvrdili da je komercijalno obrano mleko pogodno za rast bakterija *B. cereus* i da toplota ne deluje na produkciju toksina, ako se meri testom na Hep-2 ćelijama. *B. cereus* toksin cereulid je do sada jedini poznati termostabilan toksin pronađen u hrani i zbog toga Szabo i sar. (1991) i Agata i sar. (1999, 2002), smatraju da je neophodno korišćenje testova za merenje toksičnosti emetičnog toksina sojeva *B. cereusa*.

Identifikaciju na molekularnom nivou uradili su Agata i sar. (1994) i Mikkola i sar. (1999). Wang i sar. (1995) opisali su homocereulid sa molekulskom masom od 1166 Da iz morskih sojeva *B. cereus* i potvrdili su njegovu citotoksičnost. Međutim, nikada nije pokazano da homocereulid deluje kao emetični toksin, niti je povezan sa trovanjem hranom.

Agata i sar. (1999) su ustanovili da kada se isti soj *B. cereus* zaseje u komercijalno obrano mleko, moždano srčani infuzioni bujon (BHI) i tripton soja bujon (TSB), titar cereulida je veći u komercijalnom obranom mleku nego u medijima BHI i TSB. Ovi autori su razvili hemijski definisan medijum za proizvodnju cereulida. Tri amino kiseline: L - valin , L - leucin i L - treonin su od suštinskog značaja za rast *B. cereus*, kao i za proizvodnju cereulida. Kada su 2002. godine Agata i sar. ispitivali proizvodnju emetičnog toksina u namirnicama široke potrošnje, utvrdili su da je količina različita bez obzira na istu početnu količinu zasejanog soja. Posle inkubacije od 24 h, dobili su da je najviši sadržaj cereulida (320 ng/g) u kuvanom pirinču. Szabo i sar. (1991) smatraju da beli pirinač u odnosu na smeđi pirinač ima viši titar toksina.

Na produktivnost cereulida kod sojeva *B. cereus* u velikoj meri utiče temperatura ambijenta u kom se soj nalazi, ali i sam soj ima optimalnu temperaturu na kojoj raste. Tako, Szabo i sar. (1991) smatraju da je optimalna temperatura za produkciju emetogenog toksina na 20-30 °C, dok Häggblom i sar. (2002) napominju da većina emetogenih sojeva *B. cereus* raste na temperature preko 40 °C, a neke i do 52 °C (Carlin i sar., 2006; Ehling - Schulz i sar., 2006). Finlay i sar. (2000) su pokazali da niske temperature (10 °C) potiskuju rast *B. cereus*, a time je i proizvodnja emetičnog toksina smanjena. Slično tome, Häggblom i sar. (2002) su pokazali da je produkcija toksina u TSB ispod 12 °C smanjena, dok Rajkovic i sar. (2006a), nisu zabeležili produkciju emetičnog toksina ispod 12 °C u BHI bujonu. Testirajući dva soja *B. veihenstephanensis*, Thorsen i sar. (2006) utvrdili su da mogu da se razmnožavaju ispod temperature od 8 °C, ali proizvede cereulid samo na 25 °C. Häggblom i sar. (2002) su objavili da je proizvodnja emetičnog toksina kod sojeva *B. cereus* NC7401 i F4810/72 različita ako se inkubiraju u termostatu bez i sa mešanjem. Dobili su malu proizvodnju toksina prilikom inkubacije bez mešanja (< 0.02 µg ml⁻¹), u poređenju sa kulturama koje su inkubirane na rotacionoj mešalici na 150 rpm (>1 µg ml⁻¹) tokom 24 h. Agata i sar. (2002) i Finlay i sar.

(2002) primetili su veću proizvodnju emetičnog toksina u mleku koje se meša, nego prilikom mirne inkubaciji mleka. Međutim, Shaheen i sar. (2006) su testirali instant mleko za decu kao podlogu za rast *B. cereus* soj F4810/72 i pronašli su malu količinu cereulida, bez obzira da li se meša ili ne. Mnogo više koncentracije cereulida (50x) se dobije kada se inkubiraju inficirane instant žitarice sa mućkanjem u odnosu na one koje se inkubiraju na umerenom mućkanju (60 rpm), 24 h na 21-23 °C.

Na produkciju cereulida utiče i koncentracija O₂ (Rajkovic i sar 2006a), tako što kada je koncentracija O₂ manja od 1,6 vol% nema produkcije cereulide, ali kada je koncentracija 4,5 vol%, dolazi do akumulacije cereulida (oko 1000 ng mg⁻¹).

2.4 Osetljivost sojeva *B. cereus* na antibiotike

Rezistencija bakterija na antibiotike je veliki problem današnjice. Dostupnost i nekontrolisana upotreba raznolikih, efikasnih antimikrobnih preparata, među njima antibiotika, sredstava za sanitaciju i dezinfekciju, predstavljaju realnost i integralni deo našeg kompleksnog mikrobiološkog ekosistema. Isto tako, sposobnost mikroorganizama da mutiraju i adaptiraju se na različite stresore iz okoline direktno utiču na kvalitet i bezbednost hrane, a sa tim i na prenos kroz lanac ishrane. Široka upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi i vodoprivredi dovela je do "darvinovske" selekcije i preživljavanja rezistentnih uz eliminaciju osetljivih vrsta u svim ekosistemima opterećenim antibioticima.

Bakterije mogu biti urođeno rezistentne na neke antibiotike zbog nasleđenih strukturnih i funkcionalnih karakteristika, kao što su odsustvo ciljnog molekula na koji deluje antibiotik, nemogućnost antibiotika da prođe spoljašnju membranu i slično. Rezistencija na antibiotike može biti i stečena preko mutacija u hromozomalnim genima, preko horizontalnog prenosa gena ili pak kao privremena adaptacija na sredine opterećene prisustvom antibiotika (Courvalin, 2005). Kao što je način delovanja pojedinih antibiotika različit, tako su i mehanizmi rezistencije veoma raznoliki. Mogu se podeliti u tri glavne grupe: oni koji smanjuju intraćelijsku koncentraciju antibiotika utičući na njihov ulazak kroz pore ili izbacivanje iz ćelije, oni koji modifikuju ciljni molekul i oni koji inaktiviraju antibiotik hidrolizom ili modifikacijama.

Procena rizika prenosa rezistentnih klonova bakterija ili samih gena rezistencije kroz lanac hrane se usložnjava činjenicom da postoji veliki i raznoliki “pool” gena rezistencije. Geni rezistencije su široko rasprostranjeni u prirodi i prisutni su kod velikog broja nesrodnih mikroorganizama i u različitim staništima (Sundin, 2002; Riesenfeld i sar., 2004). Pored praćenja perzistentnosti rezistentnih vrsta u ekosistemima, naučna javnost naglašava značaj populacije komensala, posebno nepatogenih sojeva. Najnovije studije sprovedene na genomu izolata poreklom od ljudi, životinja i okoline pokazale su postojanje rezervoara novih i/ili nepoznatih gena rezistencije na antibiotike tzv. “intrinsic resistome” sojeve, nastalih kao posledica adaptacije, u cilju zaštite od vlastitih toksičnih metabolita i opstanka u konkurentnoj sredini (D’Costa i sar., 2011). Poznato je da je uloga antibiotika u ovim prirodnim zajednicama međučelijska komunikacija (“cell to cell signaling”), sa ciljem uspostavljanja homeostaze bakterijskih zajednica (Codero i sar., 2012).

Fenomen širenja sojeva, koji poseduju gene za rezistenciju, između ljudi i životinja je novijeg datuma i uslovljava mehanizam lateralnog transfera gena antimikrobne rezistencije, tako da pojava rezistencije među kliničkim izolatima predstavlja “vrh ledenog brega”. Kao glavne nosače gena antimikrobne rezistencije navode se komensali, što je potvrđeno u okviru projekta: “Rezervoari antimikrobne rezistencije” (Reservoirs of Antibiotic Resistance – ROAR), Udruženja za razumnu upotrebu antibiotika (Alliance for Prudent Use of Antibiotics – APUA) sprovedenog 90-tih godina prošlog veka. Savez ističe da komensali mogu poslužiti kao barometar rezistencije kod kliničkih izolata, jer po njihovom mišljenju rezistencija se prenosi od komensala ka patogenima.

Prisustvo rezistentnih sojeva i/ili gena rezistencije u hrani, nastaje u toku poljoprivredne proizvodnje kada se rezistentni sojevi iz okoline (zemljište, voda, fekalije) prenose u biljku, koja se koristi kao namirnica kako ljudi, tako i životinja. Poznata je unakrsna rezistencija na antibiotike i hemijske biocide koji se primenjuju kao dezinficijensi u industriji hrane (Buffet-Battaillon i sar., 2011; Whitehead i sar., 2011). Kako se antimikrobna rezistencija smatra biološkim hazardom, nametnula se kao neophodna, naučno zasnovana procena rizika prisustva antimikrobne rezistencije i njenog širenja kroz lanac ishrane. Detaljna uputstva predstavljena su u Vodiču za analizu rizika

antimikrobne rezistencije kroz lanac ishrane od strane Komisije Codex Alimentarius (CAC, 2011), sa ciljem da se iskontroliše potrošnja antimikrobnih preparata kod ljudi i životinja u uzgoju namenjenih za proizvodnju hrane, da se prati pojava antimikrobne rezistencije kod bakterija izolovanih iz životinja namenjenih za proizvodnju hrane, da se prouči povezanost potrošnje antimikrobnih preparata i razvoja antimikrobne rezistencije i identifikuje način i mehanizam prenosa antimikrobne rezistencije.

Iz svega navedenog, nameće se potreba praćenja prisustva antimikrobne rezistencije bakterije *B. cereus*, za koju se zna da se nalazi svuda u prirodi, spada u grupu oportunističkih bakterija i često se dovodi u vezu sa dve forme trovanja ljudi hranom, usled lučenja entero i emetičnog toksina. Patogeni sojevi *B. cereus* iz okruženja mogu direktno ili indirektno da se prenose putem hrane i da dovedu do oboljevanja ljudi. U ciklusu prenosa, sojevi mogu biti izloženi različitim uticajima životne sredine, kao i delovanju antibiotika od mikroorganizama koji potiču iz tla (Agersø i sar., 2002; You i sar., 2013).

Imajući u vidu cirkulaciju sojeva *B. cereus* u prirodi, od zemljišta preko biljaka i različitih životinja (insekti, zglavkara, drugi beskičmenjaka i sisara) do ljudi, otpornost na antibiotike, pod određenim uslovima, može se dovesti u vezu sa prenosom gena rezistencije (Schlegelova i sar., 2003; Hu i sar., 2009; Oladipo i Adejumobi, 2012). Poznato je da se geni za rezistenciju prenose između sojeva roda *Bacillus*, ali i između različitih vrsta (Agersø i sar., 2002; Whong i Kwaga, 2007; You i sar., 2013). Upoređujući sojeve izolovane iz prirode i od pacijenata, koji nisu bili izloženi uticaju antibiotika i dezinfekcionih sredstava, potvrđeno je da su oni bili osetljiviji na antibiotike. Poznato je da su sojevi *B. cereus* razvili urođene mehanizme rezistencije na β -laktamske antibiotike (Cormican i sar., 1998; Schilegelova i sar., 2003; Tewari i sar., 2012), pa čak i na antibiotike treće generacije cefalosporina (Schlegelova i sar., 2003; Ozcelik i Cıtak, 2009).

S druge strane, rezistencija se stiče usled nekontrolisane upotrebe antibiotika u poljoprivredi, veterinarskoj i humanoj medicini i tada govorimo o horizontalnom prenosu gena rezistencije: izlučivanjem fekalija u spoljnu sredinu izbacuje se rezistentni soj, koji zatim u obliku spora i vegetativnih ćelija dospeva u crevni sistem drugih životinja ili u rizosferu biljaka, a zatim direktnim kontaktom ili preko hrane ponovo do čoveka.

Zbog svega izloženog, od velikog značaja je praćenje i upoređivanje prisustva rezistencije na antibiotike kod *B. cereus* izolata iz različitih sredina (okolina, hrana, stolica pacijenata).

2.5 Molekularne metode za tipizaciju sojeva *B. cereus*

Više molekularnogenetskih metoda omogućile su filogenetsko razvrstavanje sojeva unutar *B. cereus* grupe: multilokus enzimski elektroforeza (Multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) (Helgason i sar., 1998, 2000a, c), polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (AFLP, Amplified fragment length polymorphism) (Keim i sar., 1997a; Jackson i sar., 1999; Ticknor i sar., 2001; Hill i sar., 2004; Mignot i sar., 2004) i metoda tipizacije na osnovu sekvenciranja više lokusa (MLST, Multilocus sequence typing) (Helgason i sar., 2004; Barker i sar., 2005; Tourasse i sar., 2006), koja se ujedno smatra za zlatni standard za ovakve studije. Tako su Tourasse and Kolstø (2008) upotrebili ovu metodu da razvrstaju 1400 izolata iz *B. cereus* grupe poreklom od čoveka, životinja, zemljišta, hrane i mleka. MLST je pokazala, da se vrste unutar *B. cereus* grupe mogu svrstati u tri grupe (klastera): klaster I sadrži vrste *B. anthracis*, *B. cereus* i *B. thuringiensis* i to najviše poreklom iz kliničkih izolata, klaster II sadrži *B. cereus* i *B. thuringiensis* vrste poreklom iz različitih uzoraka, uključujući uzorke hrane koji su izazivali trovanje, a klaster III je obuhvatio vrste *B. weichenstephanensis* i *B. mycoides* (Slika 6).

Osim pomenutih metoda, za tipizaciju sojeva *B. cereus* može se primeniti i RAPD (random amplified polymorphic DNA). Kod ove metode koriste se pojedinačni prajmeri sa arbitrarno izabranom sekvencom, tako da nije neophodno prethodno poznavanje redosleda nukleotida genoma koji se analizira. Prajmeri su kratki, obično sadrže 8-12 nukleotida, pa se vezuju za više komplementarnih sekvenci u genomu. Profil traka koji se dobije nakon PCR umnožavanja omogućava upoređivanje genoma različitih izolata. Za razliku od MLST analize, kod koje se amplifikuju i analiziraju određeni geni koji se sporo menjaju tokom vremena, RAPD obuhvata "fingerprinting" kompletnog genoma. Ako nastane mutacija u molekulu DNK unutar redosleda nukleotida koji je komplementaran sa prajmerom, on se neće vezati za to mesto i profil traka nakon PCR

umnožavanja će se razlikovati. Zbog toga se ovom metodom detektuju promene nastale u kratkom vremenskom periodu, pa je pogodna za primenu kod upoređivanja izolata iz jedne epidemije, sa jednog područja ili izolata iz različitih izvora. Kod RAPD analize bitan je odabir prajmera koji se primenjuje, jer nisu svi prajmeri podjednako informativni. U zavisnosti od korišćenog prajmera, RAPD se može primeniti pri analizi genodiverziteta (Bazzicalupo i sar., 1996), ali i u genskom mapiranju, taksonomskim i filogenetskim studijama mnogih organizama (Danylchenko i Sorochinsky, 2005). Kod sojeva *B. cereus* ona je primenjivana za praćenje genetičkog diverziteta enterotoksigenih sojeva (Prasad, 2014), kao i za istraživanje genetičke heterogenosti *Bacillus* izolata iz različitih zemljišta (Berić i sar., 2009). Podaci dobijeni ovom analizom pomažu da se razume genetička razlika između *B. cereus* izolata unutar ispitivane grupe ili između izolata *B. cereus* različitog porekla.

3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZA

Sojevi *B. cereus* izolovani iz stolice pacijenata, hrane i okoline razlikuju se prema zastupljenosti faktora virulencije, osetljivosti prema antibioticima i zastupljenosti genotipova

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Izolovati sojeve *B. cereus* iz uzoraka stolice pacijenata, hrane i okoline na selektivnoj podlozi.
2. Identifikovati sojeve *B. cereus* pomoću komercijalnih testova za identifikaciju Gram - pozitivnih vrsta i PCR metodom.
3. Ispitati osetljivost izolata *B. cereus* na antibiotike.
4. Dokazati prisustva gena za emetični toksin
5. Dokazati prisustvo gena za dijarejalne toksine.
6. Tipizirati izolate *B. cereus* primenom molekularne metode (RAPD)
7. Utvrditi da li postoji korelacija između RAPD profila i porekla bakterije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 PLAN ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno u četiri faze:

- izolovanje i identifikovanje bakterije *B. cereus* iz uzoraka poreklom iz stolice pacijenata, hrane i okoline
- ispitivanje osetljivosti bakterije *B. cereus* izolata na antibiotike
- detekcija gena za dijarejalni i emetični toksin kod izolata bakterije *B. cereus*
- tipizacija izolata *B. cereus* primenom RAPD metode

4.2 MATERIJAL

4.2.1 Uzorci za ispitivanje

U toku 2013. godine prikupljeno je 62 uzorka tečne stolice, hospitalizovanih i ambulantnih pacijenata, na Odeljenju za mikrobiologiju, Instituta za javno zdravlje u Nišu.

U istom periodu, 40 uzoraka hrane (čajevi, dijetetski proizvodi, začini, mleko u prahu i šunka) i 146 briseva okoline (36 iz bolničkog okruženja, 110 iz zemljišta) je prikupljeno u Odseku za sanitarnu mikrobiologiju, Instituta za higijenu, Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu i na Odeljenju genetike, Odseka za mikrobiologiju, Instituta za zemljište u Beogradu

Uzorci su klasifikovani u tri grupe: izolati iz stolice pacijenata, izolati iz hrane i izolati iz okoline.

4.2.2 Referentni soj

Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj *B. cereus* ATCC 11778, proizvođača Microbiologics, USA.

4.3 METODE

4.3.1 Kultivacija i identifikacija sojeva *B. cereus*

Svi prikupljeni uzorci stolice pacijenata dobijeni su iz Instituta za javno zdravlje, Niš, u vidu bakterijske kulture zasejane na kosom agaru (Hranjivi agar, HiMedia, Indija). Sojevi su se osvežavali presejavanjem u moždano srčani infuzioni bujon (Brain Heart Infusion, BHI bujon, HiMedia, Indija) i nakon inkubacije od 18-24 časa u termostatu na 37 °C, zasejavali na krvni agar (Baza za krvni agar, HiMedia, Indija) i Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin agar (MYP agar, HiMedia, Indija). Ponovljen je proces inkubacije: 18-24 časa u termostatu na 37 °C. Porast kolonija na ovim podlogama, tj. prisustvo β -hemolize na krvnom agaru i hrapave, ružičaste kolonije (nefermentacija manitola), sa karakterističnom talasastom zonom rasta, koja upućuje na lecitinaznu aktivnost, na MYP agaru, uz izradu Gram preparata, selektovane su za biohemijsku i molekularnu identifikaciju *B. cereus*.

Uzorci hrane prikupljeni su nakon rutinske procedure obrade uzoraka namirnica u Institutu za higijenu, VMA. Uzorci su tretirani prema standardu SRPS EN ISO 7932:2009 (Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja suspektnog *B. cereus*).

Uzorci iz okoline, uzimani su sterilnim brisom prema Vodiču za mikrobiološke kriterijume za hranu (Republika Srbija, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede, jun 2011.), a njihova dalja obrada vršena je na osnovu ISO-18593:2004 (Mikrobiologija namirnica - Horizontalni metod za tehnike uzorkovanja sa površine korišćenjem kontakt kutije i brisa).

Uzorci iz zemljišta, koji su zajedno sa brisevima iz okoline činili grupu uzoraka iz okoline, dobijeni su u vidu bakterijske kulture zasejane na kosom agaru iz Instituta za zemljište u Beogradu.

Dalja procedura je bila identična kao sa uzorcima stolice pacijenata.

4.3.2 Biohemijska identifikacija *B. cereus*

Za biohemijsku identifikaciju bakterija, korišćen je BBL Crystal Identifikacioni Sistem/ BD BBL CRYSTAL (Becton, Dickinson and Company, USA), standardizovani identifikacioni sistem za Gram-pozitivne bakterije, koji koristi 29 minijaturna biohemijska testa i bazu podataka (Interactive database V5.03A_US).

Reakcije raznih supstrata i kratko objašnjenje principa koji se koriste u sistemu opisani su u tabeli 2.

4.3.3 Ispitivanje osetljivosti sojeva *B. cereus* na antibiotike disk-difuzionom metodom

Za ispitivanje osetljivosti *B. cereus* na antibiotike korišćeni su sledeći antibiogram diskovi: ampicilin (10 µg), penicilin G (10 U), tetraciklin (30 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25/23.75 µg), eritromicin (15 µg), ciprofloksacin (5 µg), vankomicin (30 µg) i imipenem (10 U) (Bionalyse, Ankara, Turska).

Za prisustvo produkcije β-laktamaza penicilinaza korišćen je cefinaza test (Cef-F, *bioMérieux, Marcy l'Etoile*, France), dok su cefalosporinaze testirane diskovima ampicilin-klavulonska kiselina (20 µg /19 µg), ceftazidim (30 µg), cefotaksim (30 µg).

Osetljivost *B. cereus* sojeva testirana je disk-difuzionom metodom, preporučenom od strane Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Za ovu vrstu ispitivanja korišćena je podloga Mueller Hinton agar (MH agar, HiMedia, Indija). Ova podloga sadrži optimalnu koncentraciju jona kalcijuma i magnezijuma, nizak nivo timina i timidina i pH 7,2 do 7,4. Podloga se nabavlja u dehidriranom stanju i priprema se prema uputstvu proizvođača. Posle autoklaviranja (autoklav, Getinge, Nemačka) podloga se razlivala u plastične Petrijeve ploče prečnika 90 mm, tako da se dobije debljina agara 4 mm (25 ml). Petrijeve ploče sa razlivenim MH agarom čuvane su u frižideru do četrnaest dana ukoliko nisu odmah bile upotrebljene. Priprema suspenzije ispitivanih bakterija vršena je inokulacijom tri do četiri kolonije noćne kulture sa MYP agara, u 5 ml 0,8% sterilnog fiziološkog rastvora. Željena gustina suspenzije postignuta je mešanjem na vorteksu (Tehtnica, Slovenija) i upoređivanjem sa 0,5 McFarland

Tabela 2. Karakteristike i principi testa BBL Crystal za identifikaciju Gram-pozitivnih bakterija

Lokacija na panelu	Karakteristika testa	Kod	Princip
4A	Negativna fluorescentna kontrola	FCT	Kontrola sa ciljem standardizacije
		rezultata	
2A FGC	4MU-b-D-glukozid	Enzimaska hidroliza amidne ili glikozidne veze dovodi do oslobađanja fluorescentnog derivata kumarina.	
1A FVA	L-valin-AMC		
4B FPH	L-fenilalanin-AMC		
2B FGS	4MU- α -D-glukozid		
1B FPY	L-piroglutaminska kiselina-AMC		
4C FTR	L-triptofan-AMC		
2C FAR	L-arginin-AMC		
1C FGA	4MU-N-acetil-b-D-glukozaminid		
4D FHO	4MU-fosfat		
2D FGN	4MU-b-D-glukuronid		
1D FIS	L-izoleucin		
4E TRE	Trehaloza		
2E LAC	Laktoza		
1E MAB	Metil- α i b-glukozid		
4F SUC	Saharoza		
2F MNT	Manitol		
1F MTT	Maltotrioza		
4G ARA	Arabinoza		
2G GLR	Glicerol		
1G FRU	Fruktoza		
4H BGL	p-nitrofenil-b-D-glukozid	Enzimaska hidroliza bezbojnog glikozida sa supstituisanim	
2H PCE	p-nitrofenil-b-D-celobioza	arilom oslobađa žuti p-nitrofenol.	
1H	Prolin i leucin-p-nitroanilid	PLN	Enzimaska hidroliza bezbojnog amidnog supstrata oslobađa žuti p-nitroanilin.
4I PHO	p-nitrofenil-fosfat	Enzimaska hidroliza bezbojnog glikozida sa supstituisanim arilom oslobađa žuti p-nitrofenol.	
2I PAM	p-nitrofenil- α -D-maltoza		
1I PGO	o-nitrofenil-b-D-galaktozid (ONPG) i		
4J m	Urea	URE	Hidroliza uree i amonijak koji se tako dobijaju, menjaju boju pH indikatora (Bromtimol plavo)
2J	Eskulin	ESC	Kao posledica hidrolize eskulina nastaje crni talog u prisustvu jona sa trovalentnim gvožđem
	Arginin	ARG	Korišćenje arginina izaziva povećanje pH vrednosti i promenu boje indikatora (Bromkrezol purpur)

standardom koji približno odgovara broju od 1×10^8 bakterija/ml. Nakon pripreme, suspenzija ispitivanih sojeva *B. cereus* nanošena je sa sterilnim brisom preko cele ploče u tri pravca, tako da je kultura zasejana na celu površinu agara. MH agar je ostavljan na sobnoj temperaturi maksimalno 15 minuta, da bi se suspenzija upila pre postavljena diskova.

Aplikacija diskova vršena je pomoću pincete i to tako da je razmak između centara svakog diska iznosio 3 cm, a udaljenost diskova od ivice petrijeve ploče 1 cm. Ploče sa diskovima antibiotika su unutar 15 min. stavljane u termostat (Sutjeska) na inkubaciju, na temperaturi od 37 °C u trajanju od 18-24 h. Nakon inkubiranja mereni su prečnici zona inhibicije rasta za svaki antibiotik i na osnovu njih je vršeno svrstavanje sojeva *B. cereus* u kategorije S (osetljiv), I (intermedijalan) i R (rezistentan). Veličine zone inhibicije i granične vrednosti za kategorije S, I i R nisu standardizovane za *B. cereus* vrste tako da su korišćeni podaci za *Staphylococcus spp.*, a na osnovu preporuka Clinical Laboratory Standards Institute, USA, (CLSI) iz 2013. godine. (Tabela 3).

Produkcija β-laktamaza-penicilinaza određivana je cefinaza testom (Cef-F, *bioMérieux, Marcy l'Etoile, France*), dok su cefalosporinaze testirane duplim disk-difuzionim testom (ampicilin-klavulonska kiselina (20 μg /19 μg), ceftazidim (30 μg), cefotaksim (30 μg)).

Tabela 3. Korišćeni kriterijumi za očitavanje zona (u mm) i interpretaciju rezultata na osnovu preporuka CLSI (2013)

Antibiotik (disk)	Osetljiv (S)	Intermedijalno osetljiv (I)	Rezistentan (R)
Ampicilin (10 μg)	≥18	-	≤18
Penicilin G (10 U)	≥29	-	≤28
Tetraciklin (30 μg)	≥19	15-18	≤14
Trimetoprim- sulfametoksazol (1.25/23.75 μg)	≥16	11-15	≤10
Erithromicin (15 μg)	≥23	14-22	≤13
Ciprofloksacin (5 μg)	≥21	16-20	≤15
Vankomicin (30 μg)	≥17	-	≤14
Imipenem (10 U)	bilo koja zona		

4.3.4 Molekularne metode identifikacije i karakterizacije sojeva *B. cereus*

4.3.4.1 Izolacija DNK

Izolacija nukleinskih kiselin je prvi stepen u većini molekularno-bioloških ispitivanja i svim tehnikama rekombinantne DNK. Ekstrakcija nukleinskih kiselin iz biološkog materijala zahteva lizu ćelija, inaktivaciju nukleaza prisutnih u ćeliji (enzima koji prekidaju DNK i RNK lance) i odvajanje ciljne DNK od ostalog ćelijskog materijala. Za potrebe ovog istraživanja, korišćena je izolacija DNK kuvanjem. DNA uzorak je pripreman tako što se pojedinačna kolonija noćne kulture *B. cereus* izolata inkubirala u BHI bujonu (3 ml) na 37 °C, 18-24 h. Odmeravano je 1400 µl kulture. Pelet koji se dobije nakon centrifugiranja od 1 min na 12000 obrtaja/min (Centrifuga Eppendorf, Nemačka), resuspendovan je u 1ml fiziološkog rastvora, a nakon ponovnog centrifugiranja (1 min/12000 obrtaja/min), pelet je resuspendovan u 250 µl sterilne destilovane vode. Dobro je izmešan na vorteksu (Tehtnica, Slovenija) i tako pripremljen uzorak stavljen je na kuvanje 10 minuta. Uzorak je potom centrifugiran (2 min/12000 obrtaja/min) i dobijeni supernatant (izolovana DNK) je korišćen odmah za PCR ili smrzavan na -20 °C, pa potom korišćen.

4.3.4.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Test je korišćen za identifikaciju *B. cereus* grupe i za dokazivanje prisustva gena za dijarealne i emetični toksin, upotrebom specifičnih prajmera (Invitrogen, SAD) i uslova opisanih u literaturi (Tabela 4).

Reakciona smeša za PCR je pripremana u volumenu od 25 µl, sa DreamTaqGreen Master Mix (ThermoScientific, Litvanija), u finalnoj koncentraciji prajmera od 200 nM i dodavano je 2,5 µl izolovane DNK. Za PCR korišćen je thermocycler Eppendorf MasterCycler (Eppendorf, Nemačka).

PCR produkt je razdvajan na 1,5% agaroznom gelu (ICN Biomedicals, SAD), upotrebom sistema za elektroforezu (Pharmacia LKB, Švedska), a posmatran je pomoću UV transiluminatora (Pharmacia LKB, Švedska) i potom fotografisan.

Tabela 4. Prajmeri i uslovi umnožavanja kod PCR reakcije

Praimer	Redosled nuklotida (5'→3')	Uslovi PCR reakcije				Gen	Veličina fragmen- ta	Referenca
		denatu- racija ^a	vezivanje prajmera	polimeri- zacija ^b	broj ciklusa			
BalF	TGCAACTGTATTAGCACAAAGCT	94 °C	55 °C	72 °C	30	<i>bal</i>	533 bp	Sanjoy i sar. 2009
BalR	TACCACGAAGTTTGTTCCTACT	45 sec	45 sec	45 sec				
HblA1	GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC	94 °C	58 °C	72 °C	30	<i>hbla</i>	834 bp	Sanjoy i sar. 2009
HblA2	AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA	30 sec	45 sec	60 sec				
EntA	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	94 °C	52 °C	72 °C	30	<i>entFM</i>	1300 bp	Sanjoy i sar. 2009
EntB	TTAGTATGCTTTTGTGTAACC	45 sec	45 sec	60 sec				
CerF-5	CAAGTCAAGATAAGAGGCTTC	94 °C	52 °C	72 °C	35	<i>cer</i>	188 bp	Kim i sar. 2010
CerR-5	AAAGTCTTGCCAAATAACC	60 sec	60 sec	60 sec				

^a Početna denaturacija se odvijala na 95 °C i trajala je 5 minuta

^b Završna polimerizacija je trajala 5 minuta

4.3.4.3 Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je metod za razdvajanje molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja. Molekuli se razdvajaju pod dejstvom električnog polja u puferu. Negativno naelektrisani molekuli se kreću ka pozitivnoj elektrodi - katodi, dok se pozitivno naelektrisani molekuli kreću ka negativnoj elektrodi - anodi. Gel elektroforeza se koristi za karakterizaciju najznačajnije osobine - molekulske mase polinukleotida i polipeptida. Takođe, ona služi i za proveru čistoće uzoraka, heterogenosti i stepena degradacije molekula.

Agarozni gelovi prave se tako što se agaroz (ICN Biomedicals, SAD), rastvara u puferu i zagreva do tačke topljenja, zatim se sipa u kalup koji određuje dimenzije gela. Dok je agaroz tečna, u nju se postavlja „češalj" kojim se u gelu prave „bunarčići" tj. mesta u gelu koja će se popuniti uzorkom. Češljevi se polako izvuku iz gela, tako da se ne oštete bunarčići. Formirani gel se prebaci u kadicu za elektroforezu koja je napunjena puferom. Jačina pufera u kadi i u gelu mora biti ista. Osnovni princip elektroforetskog razdvajanja zasnovan je na činjenici da čestice različitog naelektrisanja i različite mase, pod uticajem električnog polja za isto vreme prelaze različite putanje na agaroznom nosaču. Po standardnoj proceduri, produkti PCR reakcija se razdvajaju na 1-1,5%

agaroznom gelu (1-1,5% agarozu u TBE), pri konstantnom naponu struje od 80 V (napajač struje, Pharmacia, LKB, Švedska). Produkti u gelu se boje etidijum bromidom (0,5 µg/ml TBE). Etidijum bromid (EtBr) se ugrađuje u lance nukleinskih kiselina i omogućava njihovu vizuelizaciju pod UV svetlom. DNK apsorbuje UV zračenje 254-320 nm koje se trasi kroz boju, a energija se reemituje na 590 nm u crvenonaranđastom regionu spektra. Etidijum bromid se priprema kao koncentrovan rastvor 10 mg/ml u vodi, čuva se zaštićen od svetla na 4 °C. Boja se dodaje direktno u gel nakon njegove pripreme. Produkti se posmatraju na transiluminatoru nad UV svetlom. Nukleinske kiseline u čije je lance inkorporiran EtBr raspoznaju se kao trake na gelu. U cilju čuvanja rezultata PCR analize, gelovi se fotografišu.

DNK standardi (markeri) za procenu molekularnih masa fragmenata DNK, koji se elektroforetski razdvajaju sadrže mešavinu poznatih veličina. Izbor markera zavisi od očekivane veličine ispitivanih fragmenata i koncentracije gela. U eksperimentima su korišćeni markeri od 50 bp (HyperLadder™50 bp, Bioline, Velika Britanija) i 100 bp "DNA ladder" (Gene Ruler™DNA Ladder Mix 100 bp, Fermentas, Litvanija).

4.3.4.4 RAPD

Za genotipsku karakterizaciju sojeva *B. cereus* korišćena je RAPD metoda. Ova metoda obuhvata PCR umnožavanje genomske DNK pomoću jednog prajmera koji ima arbitarno izabranu sekvencu, što omogućava neograničen broj sekvenci koje mogu biti izabrane kao prajmer. U toku PCR dolazi do amplifikacije delova molekula DNA i formiranja RAPD profila uzorka, koji se obično sastoji od 1-20 traka. Korišćeni su RAPD prajmeri AG15 (Mliki i dr., 2001) i SPH1 (Dolley i sar., 1993), a uslovi za amplifikaciju za RAPD dati su u tabeli 5.

Tabela 5. Prajmeri i uslovi umnožavanja kod PCR reakcije za RAPD metodu

Prajmer	Redosled nuklotida (5'→3')	Uslovi PCR reakcije				Referenca
		denaturacija ^a	vezivanje prajmera	polimerizacija ^b	broj ciklusa	
SPH1	GTG GTG GTG GTG GTG	94 °C 5 min	32 °C 60 sec	72 °C 120 sec	40	Dolley i sar. 1993
AG15	CCCACACGCA	94 °C 5 min	32 °C 60 sec	72 °C 120 sec	40	Mliki i sar. 2001.

^a Početna denaturacija se odvijala na 95 °C i trajala je 5 minuta

^b Završna polimerizacija je trajala 5 minuta

4.4 Statistička analiza

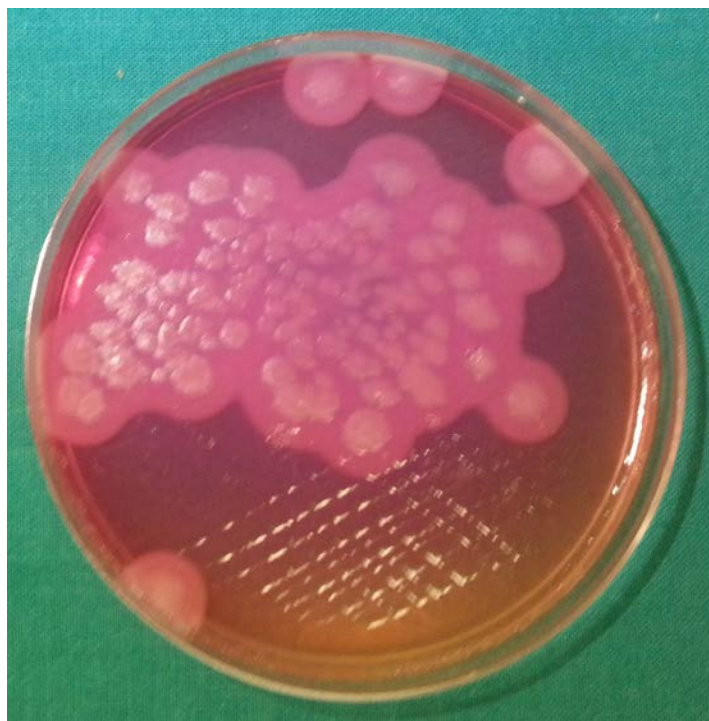
Za izračunavanje statistički značajne razlike izmrđu ispitivanih grupa korišćen je Fisher i Hi-square test. P-vrednost manja od 0,01 je smatrana za statistički značajnu. Sve statističke analize rađene su pomoću SPSS statističkog softvera za Windows verziju 11.5 (SPSS Inc., USA).

Klaster analiza RAPD profila rađena je pomoću STATISTICA 8 programa.

5. REZULTATI

Uzorci bakterija (n=62) kultivisani iz stolica hospitalizovanih i ambulantnih pacijenata, imali su karakterističan porast na MYP agaru i davali β hemolizu na krvnom agaru (Slika 7 a,b). Biohemijskim testom (BBL Crystal) i PCR metodom (prisustvo *bal* gena) (Slika 8) 30 sojeva je identifikovano kao *B. cereus*. Od 40 uzoraka hrane (čajevi, dijetetski proizvodi, začini, mleko u prahu i šunka) i od 146 briseva okoline (36 iz bolničkog okruženja, 110 iz zemljišta), istim testovima identifikovano je po 30 sojeva *B. cereus*.

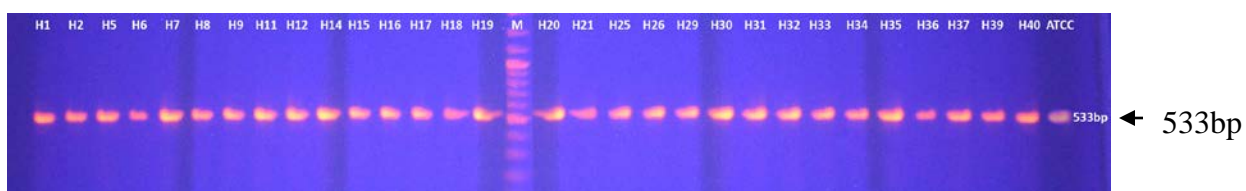
Uzorci su klasifikovani u tri grupe po 30 sojeva: izolati iz stolice pacijenata, izolati iz hrane i izolati iz okoline.



Slika 7. a) Ružičaste kolonije *B. cereus* (ne fermentuje manitol) na MYP agaru, sa karakterističnom talasastom zonom rasta, koja upućuje na lecitinaznu aktivnost



b) β -hemoliza bakterije *B. cereus* na krvnom agaru. Oko kolonija bakterije *B. cereus* vidi se karakteristična hemoliza eritrocita u vidu prosvetljenja.



Slika 8. Detekcija *bal* gena PCR metodom. Linija M: marker DNK 100 bp;
Linija ATCC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778

5.1 OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE IZOLATA *B. cereus*

Dobijeni rezultati osetljivosti sojeva *B. cereus* na antibiotike iz sve tri grupe testirani disk-difuzionom metodom, prikazani su tabelarno i grafički.

U tabelama 6, 7, 8 su prikazane zone inhibicije rasta ispitivanih sojeva *B. cereus* izražena u milimetrima za sve tri ispitivane grupe.

Svi testirani sojevi iz stolice pacijenata, hrane i okoline bili su osetljivi na imipenem i vankomicin. Isto tako, izolati *B. cereus* iz stolice pacijenata i iz hrane bili su osetljivi na eritromicin i ciprofloksacin, dok su svi uzorci iz okoline bili osetljivi na eritromicin, a jedan izolat je bio rezistentan na ciprofloksacin (3,33%) (Tabela 9).

Utvrđena je statistički značajna razlika u osetljivosti na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol upoređujući sojeve *B. cereus* iz stolice pacijenata sa uzorcima iz hrane i okoline. Od 30 sojeva iz hrane i okoline, 28 sojeva (93,34%) hrane i 25 sojeva (83,33%) iz okoline bili su osetljivi na tetraciklin, dok je 10/30 (33,33%) soja sojeva iz stolice pacijenata bilo osetljivo na ovaj antibiotik ($p < 0.001$, Fisher Exact Probability Test). Nasuprot ovim rezultatima, visoka osetljivost na trimetoprim-sulfametoksazol je utvrđena kod svih sojeva iz stolice pacijenata (100%), dok su sojevi iz hrane u 63,33% (19/30) i iz okoline u 70% (21/30), imali nižu osetljivost na ovaj antibiotik ($p < 0.01$, Fisher Exact Probability Test) (Slika 10).

Testirajući sojeve *B. cereus* na ampicilin i penicilin disk-difuzionom metodom, dobijena je osetljivost od 70% (21/30) kod uzoraka iz stolice pacijenata, dok su sojevi iz hrane i iz okoline pokazali rezistentnost na ove antibiotike: 100% (30/30) i 96,67% (29/30) (Tabela 9). Međutim, nakon urađenog nitrocefinskog testa (Slika 9), kod izolata iz sve tri grupe utvrđena je produkcija penicilinaza, što uslovljava davanje izveštaja o rezistenciji na ampicilin i penicilin kod svih testiranih sojeva *B. cereus*.

Testirajući produkciju β -laktamaza-cefalosporinaza metodom duplog diska (double disk), utvrđeno je da svi testirani sojevi *B. cereus* produkuju ovaj enzim (Slika 9), a sa tim pokazuje rezistenciju na cefalosporine.

Tabela 6. Osetljivost *B. cereus* sojeva iz stolice pacijenata na antibiotike disk-difuzionom metodom

Red. broj	Soj <i>B.cereus</i>	ANTIBIOTICI															
		Ampicillin		Penicillin		Imipenem		Vankomycin		Ciprofloxacilin		Erythromycin		Tetracycline		Trimethoprim sulphamethoxazole	
		zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.
1.	P1	0	R	0	R	24	S	17	S	28	S	27	S	23	S	20	S
2.	P4	32	S	40	S	42	S	23	S	30	S	22	S	12	R	16	S
3.	P5	42	S	40	S	50	S	24	S	36	S	24	S	0	R	20	S
4.	P7	34	S	40	S	50	S	24	S	34	S	28	S	12	R	22	S
5.	P9	34	S	46	S	54	S	28	S	36	S	26	S	12	R	24	S
6.	P10	34	S	44	S	46	S	24	S	32	S	24	S	13	R	22	S
7.	P13	40	S	44	S	50	S	26	S	30	S	22	S	12	R	24	S
8.	P14	0	R	0	R	32	S	20	S	26	S	26	S	22	S	20	S
9.	P18	0	R	0	R	24	S	22	S	32	S	28	S	24	S	24	S
10.	P21	32	S	40	S	44	S	24	S	32	S	30	S	12	R	22	S
11.	P22	26	R	36	S	42	S	23	S	30	S	22	S	10	R	16	S
12.	P27	0	R	0	R	32	S	24	S	30	S	30	S	26	S	16	S
13.	P28	0	R	0	R	32	S	22	S	30	S	24	S	24	S	20	S
14.	P29	34	S	40	S	44	S	22	S	30	S	30	S	10	R	17	S
15.	P37	34	S	40	S	50	S	24	S	34	S	22	S	10	R	20	S
16.	P40	0	R	0	R	32	S	20	S	30	S	20	S	25	S	26	S
17.	P42	34	S	40	S	44	S	21	S	30	S	22	S	20	S	16	S
18.	P43	30	S	40	S	50	S	15	S	32	S	22	S	12	R	20	S
19.	P44	30	S	30	S	44	S	24	S	32	S	22	S	21	S	17	S
20.	P45	26	R	30	S	44	S	22	S	30	S	22	S	10	R	25	S
21.	P46	32	S	40	S	40	S	20	S	30	S	22	S	10	R	17	S
22.	P47	32	S	36	S	40	S	22	S	30	S	26	S	7	R	22	S
23.	P48	0	R	0	R	22	S	21	S	30	S	30	S	21	S	20	S
24.	P51	34	S	40	S	46	S	24	S	34	S	26	S	0	R	24	S
25.	P52	40	S	40	S	40	S	24	S	30	S	22	S	15	R	20	S
26.	P53	34	S	42	S	44	S	23	S	32	S	24	S	11	R	21	S
27.	P54	32	S	40	S	46	S	22	S	32	S	30	S	10	R	20	S
28.	P56	0	R	0	R	32	S	20	S	36	S	24	S	16	R	16	S
29.	P57	0	R	0	R	26	S	22	S	30	S	30	S	37	S	20	S
30.	P58	28	R	28	R	50	S	22	S	30	S	32	S	11	R	17	S

Legenda: Kod oznake sojeva, skraćenice: „P”, označava uzorak stolice pacijenata

Skraćenica „Kat.” se odnosi na interpretativnu kategoriju (S, I i R): S - senzitiv (osetljiv); I - intermedijarno osetljiv; R - rezistentan

Tabela 7. Osetljivost *B. cereus* sojeva iz hrane na antibiotike disk-difuzionom metodom

Red. broj	Soj <i>B.cereus</i>	ANTIBIOTICI															
		Ampicillin		Penicillin		Imipenem		Vankomycin		Ciprofloxacina		Erythromycin		Tetracycline		Trimethoprim sulphamethoxazole	
		zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.
1.	H1	13	R	14	R	34	S	20	S	25	S	30	S	21	S	0	R
2.	H2	11	R	0	R	30	S	17	S	32	S	32	S	19	S	21	S
3.	H5	0	R	0	R	23	S	19	S	28	S	27	S	19	S	0	R
4.	H6	0	R	0	R	30	S	22	S	28	S	30	S	22	S	0	R
5.	H7	0	R	0	R	30	S	23	S	32	S	30	S	26	S	20	S
6.	H8	14	R	10	R	42	S	22	S	33	S	20	S	30	S	20	S
7.	H9	12	R	0	R	40	S	20	S	30	S	27	S	23	S	15	S
8.	H11	0	R	0	R	28	S	22	S	30	S	30	S	12	R	0	R
9.	H12	0	R	0	R	36	S	20	S	22	S	26	S	25	S	15	S
10.	H14	0	R	0	R	36	S	20	S	28	S	30	S	19	S	0	R
11.	H15	0	R	0	R	40	S	20	S	30	S	28	S	22	S	18	S
12.	H16	15	R	20	R	40	S	20	S	26	S	28	S	22	S	18	S
13.	H17	0	R	0	R	38	S	20	S	30	S	27	S	10	R	12	S
14.	H18	0	R	0	R	34	S	20	S	26	S	27	S	28	S	15	S
15.	H19	0	R	0	R	30	S	18	S	26	S	28	S	19	S	0	R
16.	H20	14	R	14	R	42	S	17	S	30	S	26	S	27	S	12	S
17.	H21	15	R	15	R	38	S	22	S	28	S	30	S	30	S	18	S
18.	H25	0	R	0	R	34	S	22	S	22	S	20	S	24	S	10	R
19.	H26	0	R	0	R	33	S	22	S	32	S	31	S	26	S	15	S
20.	H29	0	R	0	R	34	S	20	S	28	S	30	S	22	S	15	S
21.	H30	0	R	0	R	32	S	20	S	28	S	28	S	19	S	15	S
22.	H31	0	R	0	R	33	S	20	S	28	S	30	S	20	S	18	S
23.	H32	14	R	14	R	34	S	22	S	40	S	22	S	32	S	18	S
24.	H33	10	R	11	R	28	S	20	S	30	S	20	S	22	S	10	R
25.	H34	0	R	0	R	35	S	20	S	30	S	28	S	20	S	12	S
26.	H35	0	R	12	R	35	S	20	S	30	S	28	S	26	S	12	S
27.	H36	0	R	0	R	30	S	20	S	26	S	25	S	19	S	0	R
28.	H37	15	R	20	R	40	S	20	S	26	S	18	S	22	S	16	S
29.	H39	0	R	0	R	36	S	20	S	28	S	30	S	19	S	10	R
30.	H40	0	R	0	R	32	S	20	S	29	S	25	S	19	S	0	R

Legenda: Kod oznake sojeva, skraćenice: „H”, označava uzorak hrane

Skraćenica „Kat.” se odnosi na interpretativnu kategoriju (S, I i R): S - senzitiv (osetljiv); I - intermedijarno osetljiv; R - rezistentan

Tabela 8. Osetljivost *B. cereus* sojeva iz okoline na antibiotike disk-difuzionom metodom

Red. broj	Soj <i>B.cereus</i>	ANTIBIOTICI															
		Ampicillin		Penicillin		Imipenem		Vankomycin		Ciprofloxacina		Erythromycin		Tetracycline		Trimethoprim sulphamethoxazole	
		zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.	zona inhibicije (mm)	Kat.
1.	O1	12	R	12	R	36	S	20	S	27	S	25	S	0	R	0	R
2.	O3	14	R	12	R	36	S	22	S	30	S	22	S	30	S	0	R
3.	O4	0	R	0	R	25	S	20	S	25	S	26	S	19	S	16	S
4.	O5	16	R	14	R	36	S	22	S	14	R	26	S	24	S	18	S
5.	O6	0	R	0	R	36	S	22	S	28	S	28	S	20	S	10	R
6.	O7	0	R	0	R	34	S	20	S	30	S	28	S	25	S	16	S
7.	O11	12	R	12	R	34	S	22	S	35	S	20	S	30	S	18	S
8.	O12	15	R	12	R	37	S	21	S	28	S	24	S	22	S	16	S
9.	O14	0	R	0	R	30	S	19	S	25	S	19	S	22	S	0	R
10.	O28	0	R	0	R	26	S	18	S	28	S	28	S	12	R	16	S
11.	O29	0	R	0	R	24	S	19	S	28	S	26	S	21	S	0	R
12.	O30	0	R	0	R	35	S	20	S	30	S	22	S	22	S	16	S
13.	O31	0	R	0	R	26	S	20	S	27	S	26	S	11	R	0	R
14.	O32	0	R	0	R	28	S	18	S	28	S	24	S	22	S	0	R
15.	O33	0	R	0	R	24	S	21	S	28	S	26	S	22	S	19	S
16.	O34	0	R	0	R	34	S	19	S	27	S	26	S	27	S	0	R
17.	O35	20	S	37	S	40	S	20	S	26	S	18	S	0	R	16	S
18.	O36	0	R	0	R	34	S	19	S	28	S	26	S	22	S	16	S
19.	Z1	10	R	12	R	30	S	21	S	30	S	26	S	23	S	25	S
20.	Z5	0	R	0	R	26	S	20	S	32	S	27	S	19	S	27	S
21.	Z11	0	R	0	R	28	S	21	S	31	S	28	S	27	S	30	S
22.	Z17	8	R	10	R	24	S	20	S	30	S	26	S	12	R	17	S
23.	Z19	18	R	20	R	40	S	20	S	30	S	23	S	24	S	0	R
24.	Z22	0	R	0	R	26	S	20	S	28	S	26	S	23	S	20	S
25.	Z24	0	R	0	R	28	S	20	S	30	S	30	S	27	S	22	S
26.	Z26	10	R	10	R	39	S	22	S	35	S	26	S	24	S	26	S
27.	Z29	10	R	10	R	38	S	21	S	32	S	28	S	24	S	18	S
28.	Z30	10	R	10	R	32	S	20	S	30	S	28	S	28	S	16	S
29.	Z31	10	R	12	R	34	S	18	S	28	S	30	S	28	S	16	S
30.	Z34	10	R	10	R	34	S	20	S	28	S	26	S	30	S	16	S

Legenda: Kod oznake sojeva, skraćenice: „O i Z”, označavaju uzorak iz okoline i zemljišta

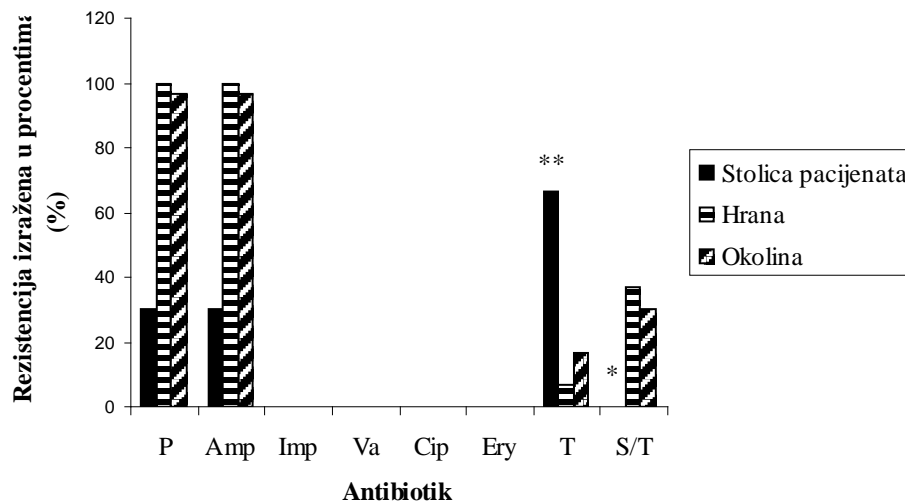
Skraćenica „Kat.” se odnosi na interpretativnu kategoriju (S, I i R): S - senzitiv (osetljiv); I - intermedijarno osetljiv; R - rezistentan

Tabela 9. Osetljivost *B. cereus* sojeva na odabrane antibiotike primenom disk-difuzione metode

Antibiotski disk	Stolica pacijenata		Hrana		Okolina	
	n=30		n=30		n=30	
	S	R	S	R	S	R
Ampicilin (10 µg)	21 (70%)	9 (30%)	0	30 (100%)	1 (3.33%)	29 (96.67%)
Penicilin (10 U)	21 (70%)	9 (30%)	0	30 (100%)	1 (3.33%)	29 (96.67%)
Imipenem (10 U)	30 (100%)	0	30 (100%)	0	30 (100%)	0
Vankomicin (30 µg)	30 (100%)	0	30 (100%)	0	30 (100%)	0
Ciprofloksacin (5 µg)	30 (100%)	0	30 (100%)	0	29 (96.67%)	1 (3.33%)
Eritromcin (15 µg)	30 (100%)	0	30 (100%)	0	30 (100%)	0
Tetraciklin (30 µg)	10 (33.33%)	20 (66.67%)	28 (93.33%)	2 (6.67%)	25 (83.33)	5 (16.67%)
Trimetoprim sulfametoksazol (1,25/23,75 µg)	30 (100%)	0	19 (63.33%)	11 (36.67%)	21 (70%)	9 (30%)

n: broj izolata; S: osetljivo; R: rezistentno

Utvrđivanje produkcije penicilinaza
nitrocefinskim testomUtvrđivanje produkcije cefalosporinaze
duplim disk testSlika 9. Aktivnost β -laktamaza: penicilinaze i cefalosporinaze



Slika 10. Rezistencija sojeva *B. cereus* različitog porekla na odabrane antibiotike
 Amp: Ampicilin; P: Penicilin; Imp: Imipenem; Va: Vankomicin; Cip: Ciprofloxacilin; Ery: Eritromcin;
 T: Tetraciklin; S/T: trimetoprim-sulfametoksazol;
 ** $p < 0.001$; * $p < 0.01$ Statistički značajna razlika u rezistenciji na tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol je potvrđena, upoređujući izolate *B. cereus* iz stolice pacijenata, hrane i okoline

5.2 DETEKCIJA GENA ZA ENTEROTOKSINE I EMETIČNI TOKSIN

Prisustvo gena za enterotoksin (*hbla* i *entFM* geni) i emetični toksin (*cer* gen) potvrđeno je PCR metodom. Dobijeni rezultati za sve tri ispitivane grupe prikazani su u Tabelama 10, 11, 12.

Upotrebom specifičnog para prajmera HblA1/HblA2 detektovano je prisustvo *hbla* gena i dobijeni su amplifikacioni produkti od 834 bp i to kod 29/30 izolata iz stolice pacijenata, 23/30 izolata iz hrane i kod 24/30 izolata iz okoline (Slika 11).

ENTA/ENTB parom prajmera detektovano je prisustvo *entFM* gena, a amplifikacioni produkt od 1,3 kb je bio prisutan kod svih izolata iz stolice pacijenata i

hrane (30/30), dok kod dva (28/30) izolata iz okoline nije detektovano prisustvo ovog gena (Slika 12).

Prisustvo *cer* gena za emetični toksin, potvrđeno je CerF5/CerR5 parom prajmera. Dobijeni amplifikacioni produkt od 188 bp dobijen je kod svih izolata iz stolice pacijenata (30/30), kod 28/30 izolata iz hrane i kod 25/30 izolata iz okoline (Slika 13).

Tabela 10. Prisustvo gena za enterotoksin i emetični toksin kod izolata iz stolice pacijenata (P)

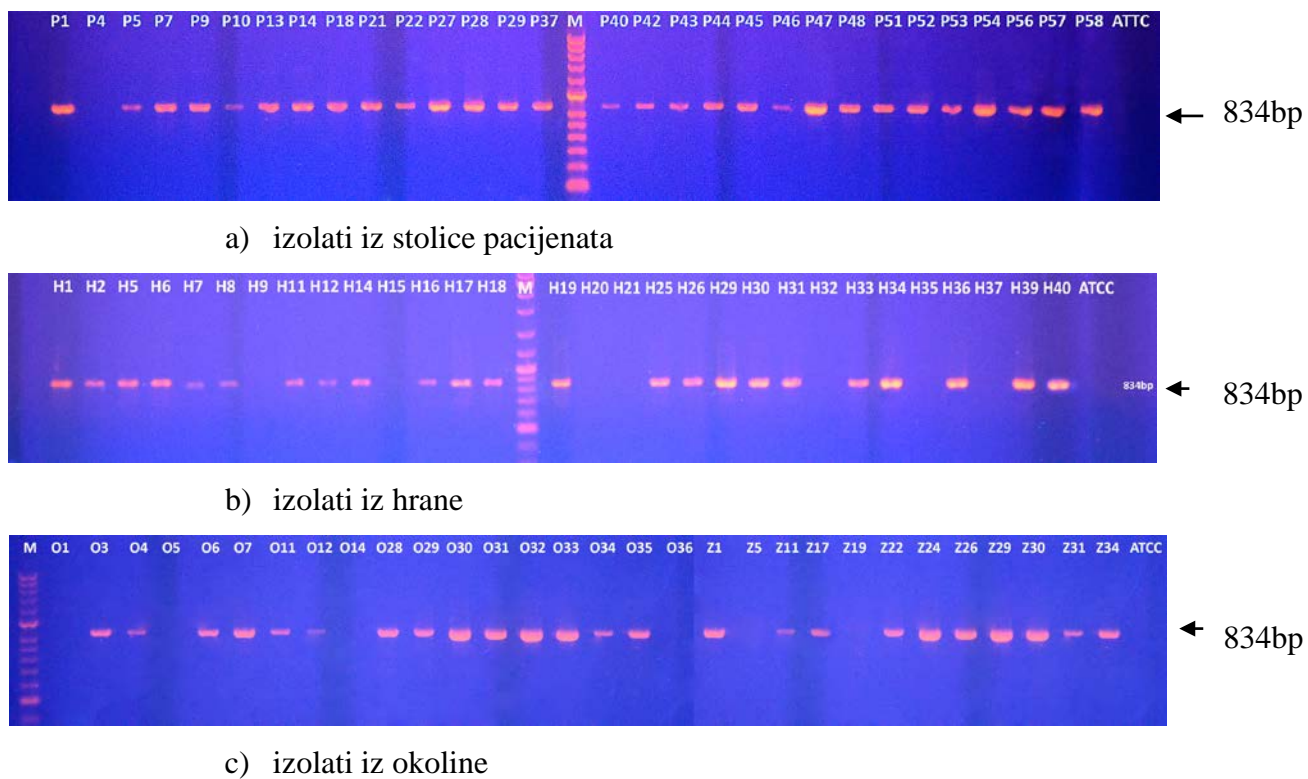
Redni broj	Soj <i>B. cereus</i>	Enterotoksin geni		Emetični gen
		<i>hbla</i>	<i>entFM</i>	<i>cer</i>
1.	P1	+	+	+
2.	P4	–	+	+
3.	P5	+	+	+
4.	P7	+	+	+
5.	P9	+	+	+
6.	P10	+	+	+
7.	P13	+	+	+
8.	P14	+	+	+
9.	P18	+	+	+
10.	P21	+	+	+
11.	P22	+	+	+
12.	P27	+	+	+
13.	P28	+	+	+
14.	P29	+	+	+
15.	P37	+	+	+
16.	P40	+	+	+
17.	P42	+	+	+
18.	P43	+	+	+
19.	P44	+	+	+
20.	P45	+	+	+
21.	P46	+	+	+
22.	P47	+	+	+
23.	P48	+	+	+
24.	P51	+	+	+
25.	P52	+	+	+
26.	P53	+	+	+
27.	P54	+	+	+
28.	P56	+	+	+
29.	P57	+	+	+
30.	P58	+	+	+

Tabela 11. Prisustvo gena za enterotoksin i emetični toksin kod izolata iz hrane (H)

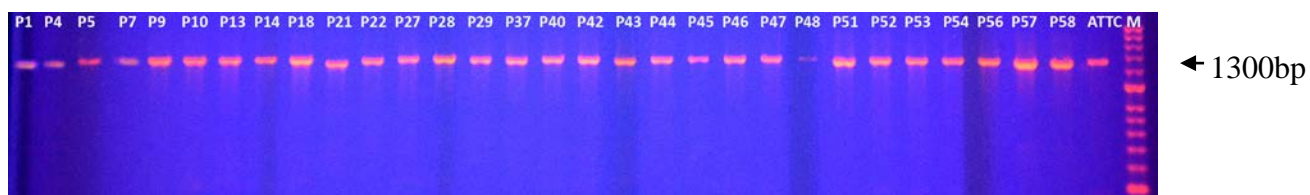
Redni broj	Soj <i>B. cereus</i>	Enterotoksin geni		Emetični gen
		<i>hbla</i>	<i>entFM</i>	<i>cer</i>
1.	H1	+	+	+
2.	H2	+	+	+
3.	H5	+	+	+
4.	H6	+	+	+
5.	H7	+	+	+
6.	H8	+	+	+
7.	H9	-	+	+
8.	H11	+	+	+
9.	H12	+	+	+
10.	H14	+	+	+
11.	H15	-	+	+
12.	H16	+	+	+
13.	H17	+	+	+
14.	H18	+	+	+
15.	H19	+	+	+
16.	H20	-	+	+
17.	H21	-	+	+
18.	H25	+	+	+
19.	H26	+	+	+
20.	H29	+	+	+
21.	H30	+	+	+
22.	H31	+	+	+
23.	H32	-	+	+
24.	H33	+	+	+
25.	H34	+	+	+
26.	H35	-	+	+
27.	H36	+	+	+
28.	H37	-	+	-
29.	H39	+	+	-
30.	H40	+	+	+

Tabela 12. Prisustvo gena za enterotoksin i emetični toksin kod izolata iz okoline (O=okolina; Z=zemljište)

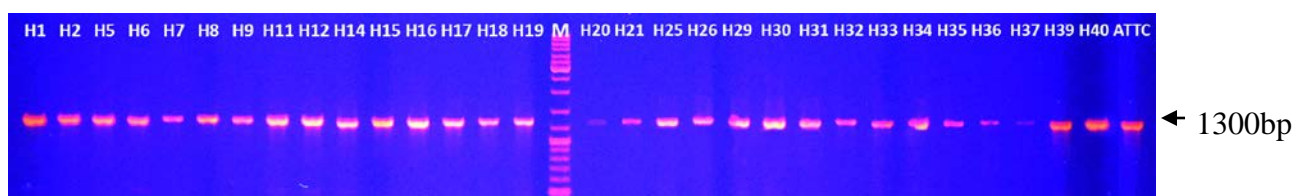
Redni broj	Soj <i>B. cereus</i>	Enterotoksin geni		Emetični gen
		<i>hbla</i>	<i>entFM</i>	<i>cer</i>
1.	O1	-	-	-
2.	O3	+	+	+
3.	O4	+	+	+
4.	O5	-	+	-
5.	O6	+	+	-
6.	O7	+	+	+
7.	O11	+	+	+
8.	O12	+	+	+
9.	O14	-	+	-
10.	O28	+	+	+
11.	O29	+	+	-
12.	O30	+	+	+
13.	O31	+	+	+
14.	O32	+	+	+
15.	O33	+	+	+
16.	O34	+	-	+
17.	O35	+	+	+
18.	O36	-	+	+
19.	Z1	+	+	+
20.	Z5	-	+	+
21.	Z11	+	+	+
22.	Z17	+	+	+
23.	Z19	-	+	+
24.	Z22	+	+	+
25.	Z24	+	+	+
26.	Z26	+	+	+
27.	Z29	+	+	+
28.	Z30	+	+	+
29.	Z31	+	+	+
30.	Z34	+	+	+



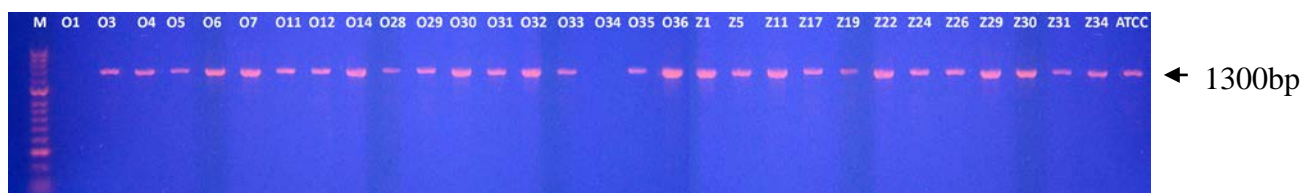
Slika 11. Detekcija *hbla* gena PCR metodom. Linija M: marker DNK 100 bp;
Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778



a) izolati iz stolice pacijenata

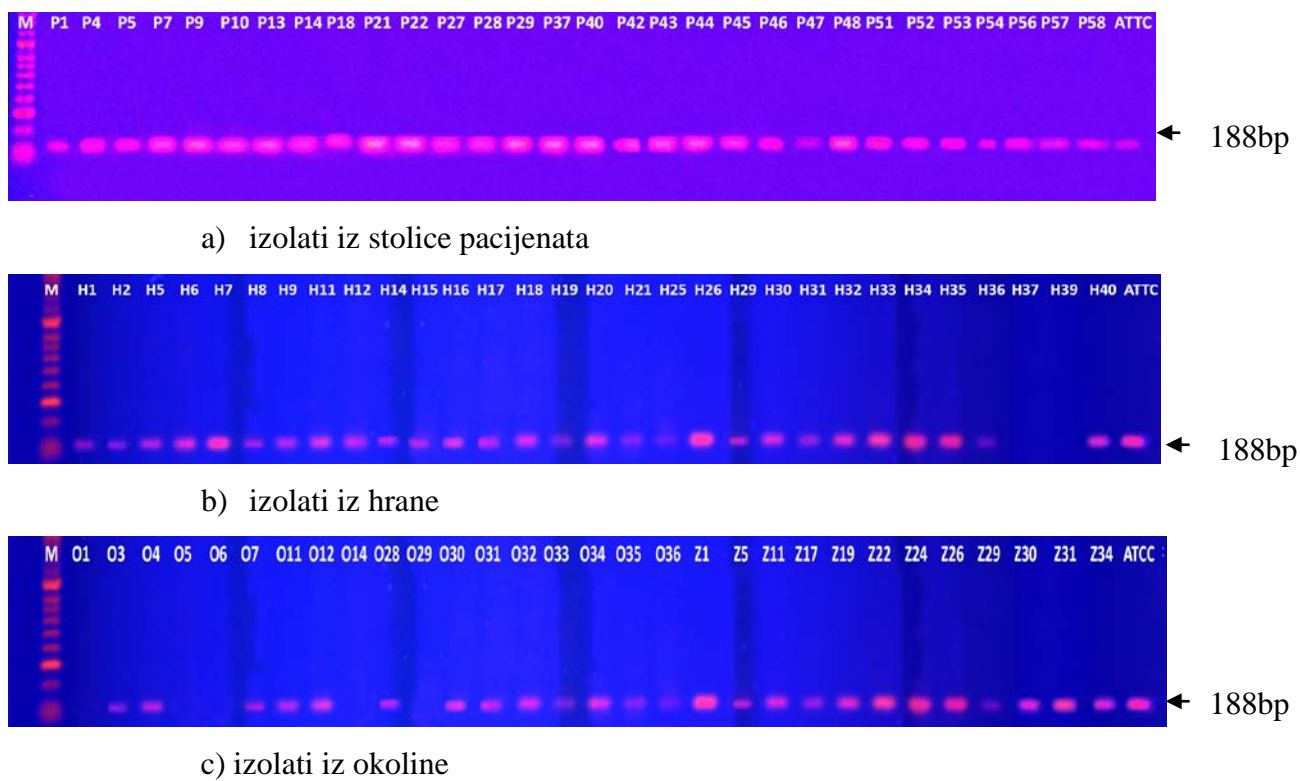


b) izolati iz hrane



c) izolati iz okoline

Slika 12. Detekcija *entFM* gena PCR metodom. Linija M: marker DNK 100 bp;
Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778



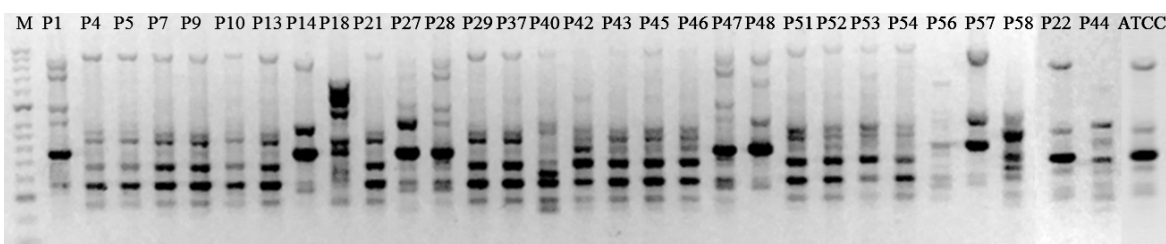
Slika 13. Detekcija *cer* gena PCR metodom. Linija M: marker DNK 50 bp;
Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778

5.3 GENETIČKA KARAKTERIZACIJA (TIPIZACIJA) IZOLATA

B. cereus RAPD ANALIZOM

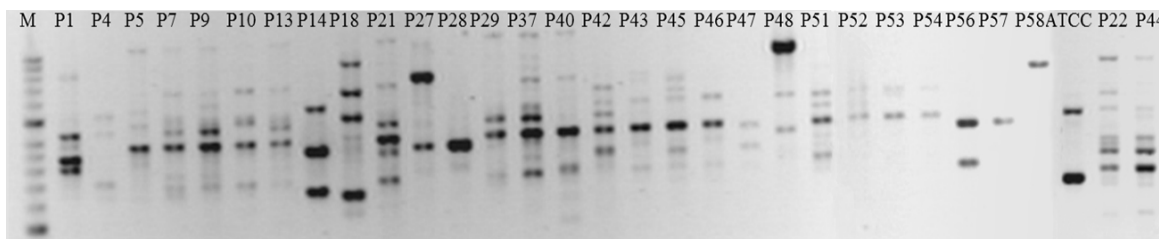
Za karakterizaciju izolata *B. cereus* primenom RAPD analize, korišćeni su prajmeri SPH1 i AG15. Dobijeni rezultati omogućili su tipiziranje svih ispitivanih uzoraka, i njihovo upoređivanje kako unutar grupa (izolata stolice pacijenata, hrane, okoline) tako i između grupa. Na osnovu RAPD profila dobijenih amplifikacijom pomoću SPH1 i AG15 prajmera, izrađeni su zbirni dendrogrami.

Na osnovu zbirne RAPD analize (Slika 14, 15) unutar grupe izolata iz stolice pacijenata, formirana su dva klastera (grupe) (Slika 16). Razlika između dva klastera iznosila je 68%. Oba klastera su podeljena na dva subklastera (podgrupe), sa međusobnom razlikom od 25% između subklastera u klasteru I i sa razlikom od 61% između subklastera unutar klastera II. Klaster I obuhvatao je 20 izolata, sa po 10 izolata u svakom subklasteru, a klaster II, 10 izolata, od kojih je osam grupisano u prvom subklasteru, a dva u drugom. Unutar svakog subklastera formirane su po dve grane sa različitim brojem izolata. Na nivou međusobne sličnosti na vrednosti od 80% odabrano je sedam izolata stolice pacijenata (P1, P18, P14, P56, P58, P43, P21) koji su korišćeni u RAPD analizi za upoređivanje izolata između grupa (izolata stolice pacijenata, hrane, okoline).

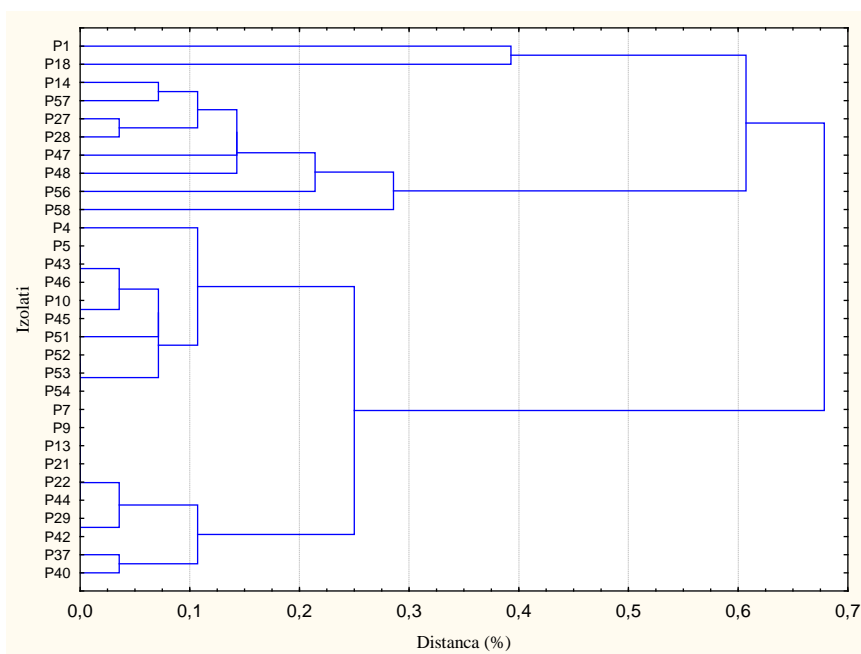


Slika 14. RAPD profil izolata *B. cereus* iz stolice pacijenata na osnovu SPH1 prajmera.

Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATCC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778



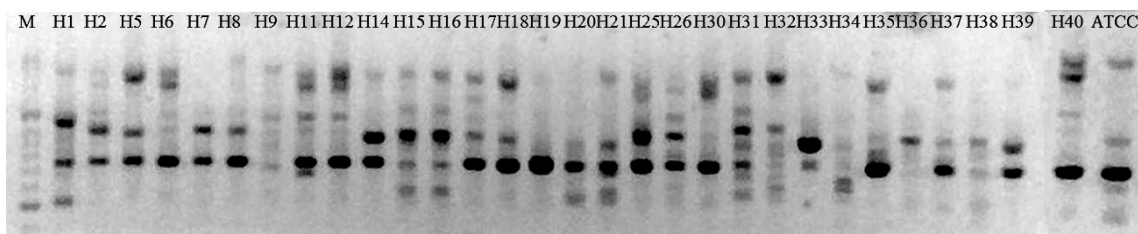
Slika 15. RAPD profil izolata *B. cereus* iz stolice pacijenata na osnovu AG15 prajmera
Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATCC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778



Slika 16. Dendrogram na osnovu RAPD profila izolata *B. cereus* iz stolice pacijenata, dobijenih pomoću SPH1 i AG15 prajmera

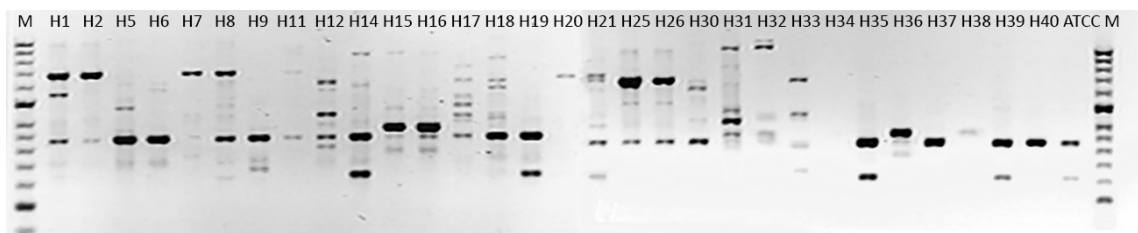
U okviru grupe izolata iz hrane RAPD analizom (Slika 17, 18) dobijen je dendrogram (Slika 19) u okviru kog se izdvajaju dva klastera, sa međusobnom razlikom od 55%. Klaster I obuhvatao je dva subklastera, od kojih je subklaster 1 imao šest izolata, a subklaster 2 tri izolata, dok je klaster II obuhvatao dva subklastera, od kojih je subklaster 1 sadržavao 2 izolata, a drugi 18 izolata. Međusobna razlika od 38% utvrđena je između subklastera u klasteru I i razlika od 52% između subklastera unutar klastera II. Unutar svakog subklastera formirane su po dve grane. Na nivou međusobne sličnosti na vrednosti od 80% odabrano je 13 izolata iz hrane (H25, H17, H8, H12, H5, H14, H15,

H30, H31, H19, H21, H33, H39) koji su korišćeni u RAPD analizi za upoređivanje izolata između grupa (izolata stolice pacijenata, hrane, okoline).



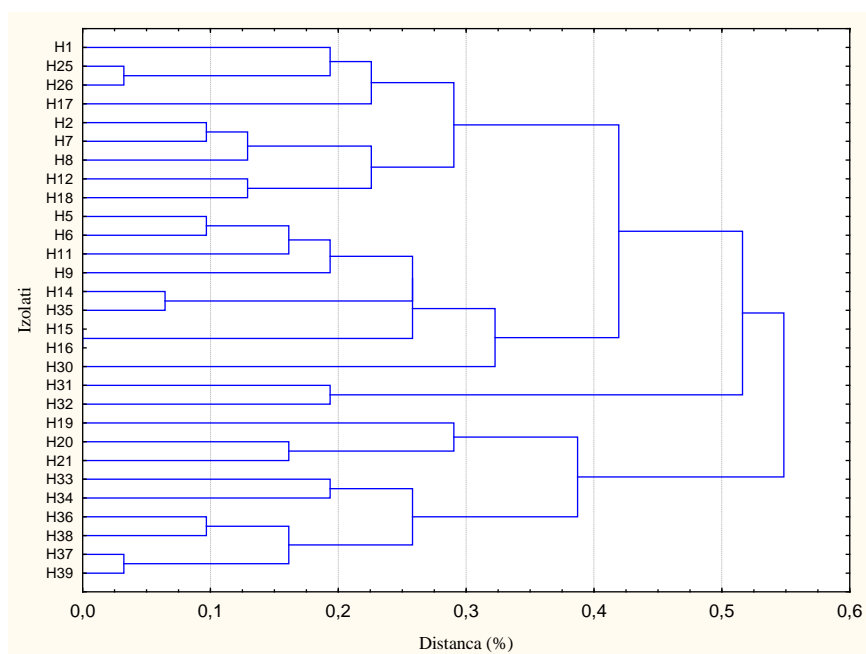
Slika 17. RAPD profil izolata *B. cereus* iz hrane na osnovu SPH1 prajmera

Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778



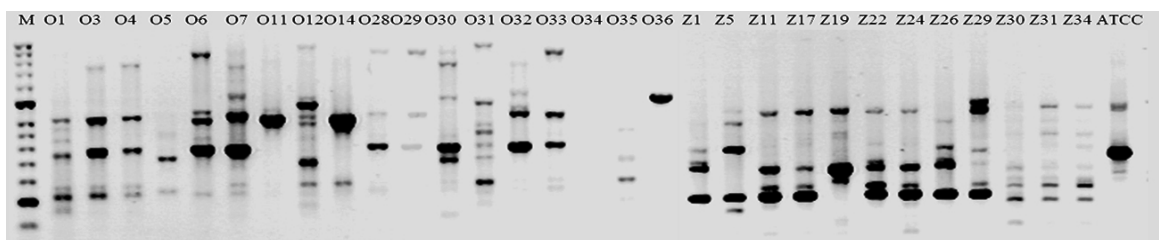
Slika 18. RAPD profil izolata *B. cereus* iz hrane na osnovu AG15 prajmera

Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATCC 11778



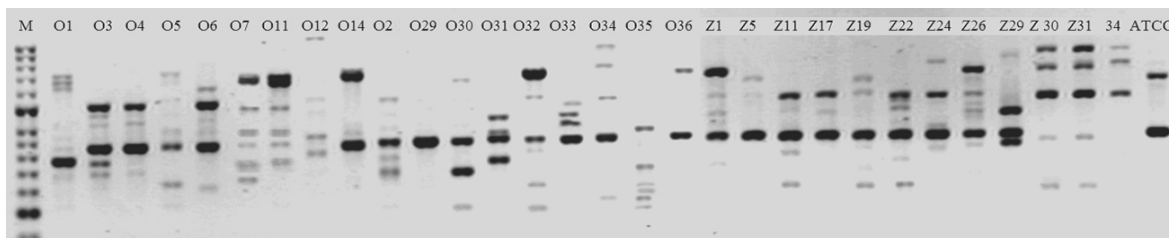
Slika 19. Dendrogram na osnovu RAPD profila izolata *B. cereus* iz hrane, dobijenih pomoću SPH1 i AG15 prajmera

Izolati uzoraka iz okoline RAPD analizom (Slika 20, 21) formirali su dva klastera (Slika 22), sa razlikom od 54%. Klasteri su se podelili u dva subklastera, sa međusobnom razlikom od 32% između subklaster unutar kalastera I i razlikom od 43% između subklastera unutar klastera II. Subklaster 1 unutar kalastera I obuhvatao je samo izolat O35, a subklaster 2 soj O31 i O12, dok se unutar klastera II izdvojilo tri subklastera: subklaster 1 i 2 sa po četiri izolata i subklaster 3 sa 19 izolata. Na nivou međusobne sličnosti na vrednosti od 80% odabrano je 13 izolata iz okoline (O1, O6, O3, Z11, Z19, O14, Z26, O32, O30, Z30, O12, O31, O35) koji su korišćeni u RAPD analizi za upoređivanje izolata između grupa (izolata stolice pacijenata, hrane, okoline).



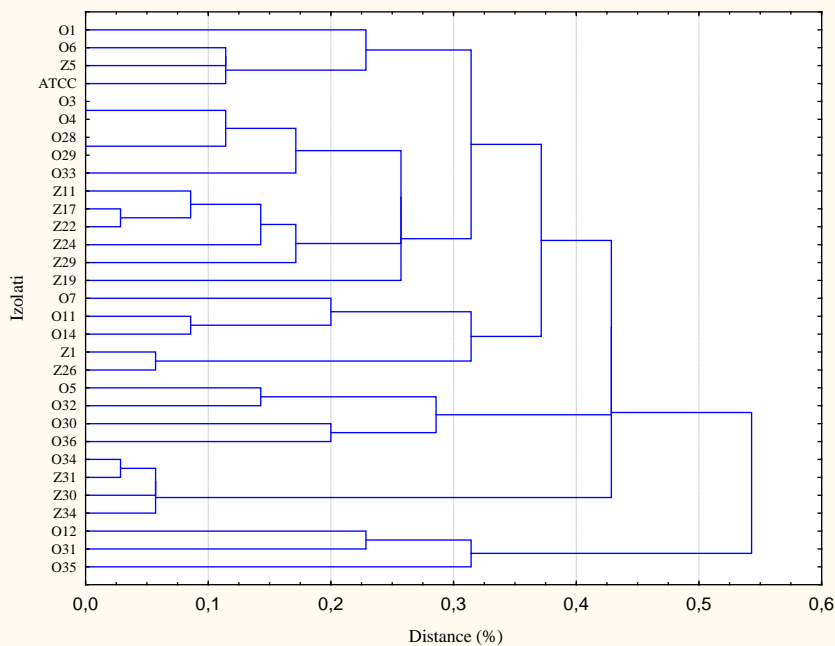
Slika 20. RAPD profil izolata *B. cereus* iz okoline na osnovu SPH1 prajmera

Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778



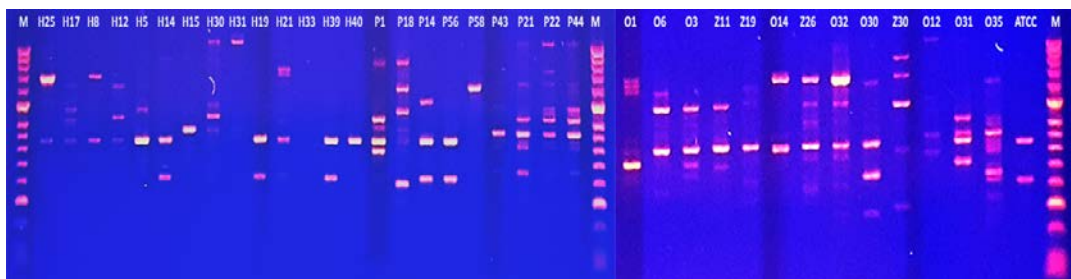
Slika 21. RAPD profil izolata *B. cereus* iz okoline na osnovu AG15 prajmera

Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778

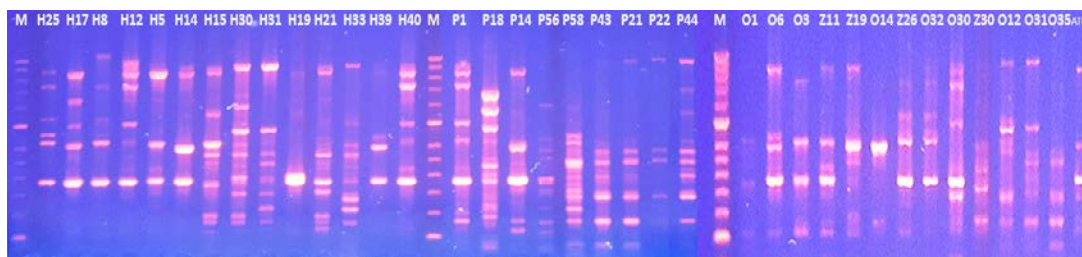


Slika 22. Dendrogram na osnovu RAPD profila izolata *B. cereus* iz okoline, dobijenih pomoću SPH1 i AG15 prajmera

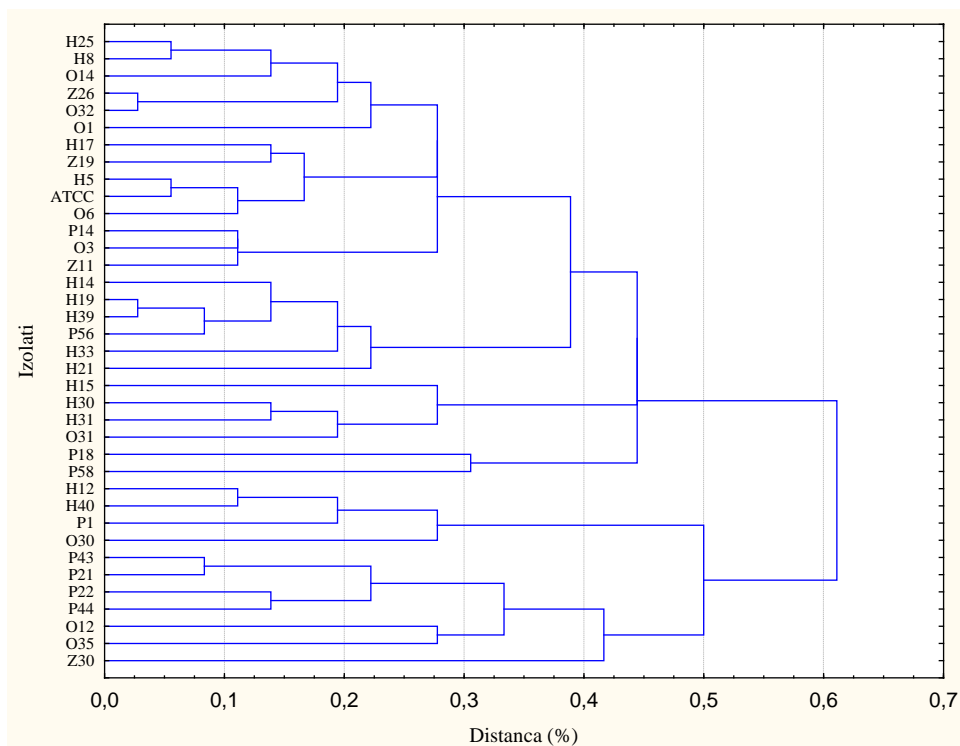
Da bi se uporedili izolati između grupa (stolice pacijenata, hrana, okolina) urađena je RAPD analiza (Slika 23, 24) sa odabranim izolatima iz sve tri grupe. Karakterizacija izolata predstavljena je zbirnim dendrogramom (Slika 25), konstruisanim na osnovu profila dobijenih amplifikacijom frgmenata pomoću dva prajmera (SPH1 i AG15). Na osnovu zbirne analize izolati su formirali dva klastera, sa međusobnom razlikom od 61%. Klaster I sadržao je dva subklastera, sa razlikom od 50%, a klaster II sadržao je tri subklastera sa međusobnom razlikom od 45%. Unutar klastera I ukupno se nalazilo 11 izolata i to: sedam izolata u subklasteru 1 i četiri izolata u subklasteru 2. Unutar klastera II nalazilo se 25 izolata koji su grupisani u subklaster 1 sa dva izolata, subklaster 2 sa četiri izolata i subklaster 3 sa 19 izolata, među kojima je bio i ATCC soj.



Slika 23. RAPD profil odabranih izolata *B. cereus* iz sve tri grupe na osnovu AG15 prajmera
Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778



Slika 24. RAPD profil odabranih izolata *B. cereus* iz sve tri grupe na osnovu SPH1 prajmera
Linija M: marker DNK 50 bp; Linija ATTC: Referentni soj *B. cereus* ATTC 11778



Slika 25. Dendrogram na osnovu zbirnog RAPD profila od odabranih izolata *B. cereus* iz sve tri grupe, dobijenih sa SPH1 i AG15 prajmerom

6. DISKUSIJA

Na osnovu svojih sposobnost da izazove infekcija kod ljudi *B. cereus* je klasifikovan u grupu organizama drugog stepena opasnosti (Evropska komisija, 1993). *B. cereus*, od svih vrsta roda *Bacillus* najčešće izaziva alimentarne intoksikacije i toksikoinfekcije kod ljudi. Poslednjih decenija učestalost trovanja hranom je poraslo (Varnam i Evans, 1991), bez obzira na strogu mikrobiološku kontrolu u toku proizvodnje i obrade namirnica (Žlender, 2003).

Primena antimikrobnih preparata, posebno antibiotika u poljoprivredi, humanoj i veterinarskoj medicini, doveli su do razvoja sojeva *B. cereus* otpornih na antibiotike. Imajući u vidu cirkulaciju *B. cereus* u prirodi, od zemlje do biljaka i različitih životinja (insekti, zglavkara, drugi beskičmenjaka i sisara) pa do ljudi, otpornost na antibiotike, pod određenim uslovima, dovodi se u vezu sa prenosom gena za rezistenciju (Schlegelova i sar., 2003; Hu i sar., 2009; Oladipo i Adejumobi, 2012). Poznato je da se geni za rezistenciju prenose između sojeva roda *Bacillus* i između različitih vrsta (Agersø i sar., 2002; Whong i Kwaga, 2007; You i sar., 2013).

Iako se prisustvo patogenih sojeva *B. cereus* dovodi najčešće u vezu sa toksikoinfekcijama vezanim za gastrointerstinalni sistem, novija istraživanja ovu bakteriju dovode u vezu sa infekcijama u neonatologiji, hiruškim i traumatološkim ranama, intravenskim davanjem lekova, plasiranjem katetera, kao i invazivnim bakterijemijama centralnog nervnog sistema (meningitis i apsces mozga), endoftalmitisom, pneumonijom i gasnom gangrenom (Bottone, 2010), tako da se *B. cereus* sve češće izoluje iz kliničkih uzoraka koji nisu vezani za gastroenteralni sistem (krv, rana, sputum) i to u imunokompromitovanih pacijenata. Nasuprot tome, kod pacijenata sa stomahnim problemima *B. cereus* je prisutan u stolici i imunokompetetnih i kompromitovanih pacijenata (Richards i sar., 1988; Ozkocaman i dr, 2006). Registrovanje smrtnih slučajeva (Ginsburg i sar., 2003; Bottone, 2010; Brown i sar., 2012) izazvanih sojevima *B. cereus*, usled zakasnele dijagnostike ili neadekvatanog odgovora na antibiotsku terapiju, ukazalo je na veliku važnost uvođenja metoda za brzu dijagnostiku bakterija *B. cereus* i odredi osetljivost na antibiotike, tj. utvrdi

rasprostranjenost rezistentnih sojeva *B. cereus* izolovanih iz različitih uzoraka (stolice pacijenata, okoline, hrane).

Poznato je da sojevi *B. cereus* poseduju urođene mehanizme rezistencije. Tako proizvodnja beta-laktamaza može da dovede do rezistencije na treću generaciju cefalosporina i penicilina (Cormican i sar., 1998; Schlegelova i sar., 2003; Özcelik i Cıtak, 2009; Tewari i sar., 2012). U okviru naših ispitivanja utvrđena je rezistencija kod svih testiranih *B. cereus* izolata na cefalosporine treće generacije, penicilin i ampicilin, koristeći metode za otkrivanje produkcije cefalosporinaze i penicilinaze: metoda dvostrukog diska i nitrocefinski test.

U mnogim studijama potvrđeno je postojanje beta-laktamaza i time otpornost na penicilin, ampicilin i cefalosporine u različitim vrstama uzoraka (Weber i dr., 1988, Aslim, 2002; Schlegelova i sar., 2003, Turnbull i sar., 2004; Abdel - Shakour i Roushdy, 2010; Chon i sar., 2012). Tako, na osnovu svog rada Özcelik and Cıtak (2009) nakon što su utvrdili postojanje rezistencije na beta-laktamske antibiotike, zaključili su da je ona posledica širenja gena za rezistenciju među sojevima *B. cereus* izolovanih iz sladoleda. Međutim, ne postoji objašnjenje da li je rezistentnost sojeva *B. cereus* iz sladoleda rezultat prenosa rezistentnih gena između mikroorganizama u digestivnom traktu, procesom konjugacije ili transdukcije, ili su sojevi već imali rezistentan gen koji kruži u okruženju.

GodičTorkar i Seme (2009) napominju da pored prisustva penicilinaze i cefalosporinaze, sojevi *B. cereus* izolovani iz uzoraka od pacijenata i iz hrane imaju mogućnost produkcije metalo-beta-laktamaza, a time i mogućnost za rezistenciju na karbapeneme. U našem istraživanju utvrdili smo da su svi *B. cereus* sojevi iz sve tri grupe bili osetljivi na imipenem. Osetljivost na ovaj antibiotik uočava se i u istraživanju drugih autora. Samo Luna i sar. (2007) ističu prisustvo 14% rezistentnih izolata iz okruženja u SAD na karbapenem (meropenem).

Pored stopostotne osetljivosti na imipenem, svi sojevi u našem radu bili su osetljivi na vankomicin i eritromicin. Osetljivost na ciprofloksacin potvrđena je u svim izolatima iz stolice pacijenata i iz hrane, a samo jedan uzorak iz okruženja bio je rezistentan na ovaj antibiotik.

Slično ovim rezultatima, Banerjee i sar. (2011) dobili su stoprocentnu osetljivost na ciprofloksacin i imipenem kod uzoraka *B. cereus* od pacijenata. Drugi autori su (Özcelik i Čitak, 2009; Oladipo i Adejumbi 2010; Srinu, 2012) testirajući osetljivost na ciprofloksacin u uzorcima iz hrane, dobili iste rezultate. Osetljivost na vancomicin i ciprofloksacin potvrđuju Jensen i sar. (2001) kod *B. cereus* izolata iz poljoprivrednog zemljište iz Danske.

Različiti rezultati se mogu videti prilikom praćenja rezistencije na eritromicin. Tako, Özcelik i Čitak (2009) utvrdili su rezistenciju na eritromicin samo kod 1/34 izolata iz sladoleda, ali Oladipo i Adejumobi (2010) su utvrdili rezistenciju na ovaj antibiotik u svim izolatima *B. cereus* dobijenim iz uzoraka hrane proizvedene na ulici. Za razliku od naših rezultata, Al-Khatib i sar. (2007) i GodičTorkar i Seme (2009) u svojim istraživanjima rezistentnost na eritromicin ustanovili su u oko 40% uzoraka iz stolice pacijenata. Upoređujući rezistenciju na eritromicin između izolata iz stolice ljudi, mesa i gotovih mesnih proizvoda, Tewari i sar. (2012) utvrdili su da su 73,91% izolata iz stolice ljudi bili osetljivi, dok su 48,3% i 54,5% izolata iz mesa i mesnih proizvoda bili rezistentni na ovaj antibiotik. Nasuprot tome, Aslim (2002) i Luna i sar. (2007) ukazali su na visok nivo osetljivosti na eritromicin u uzorcima *B. cereus* izolovanim iz okruženja. Velika raznolikost u osetljivosti na eritromicin ukazuje na potrebu stalne provere prisustva rezistentnih sojeva na ovaj antibiotik iz različitih sredina.

Ispitujući osetljivost na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol u našem radu uzvrdili smo statistički značajnu razliku, upoređujući izolate iz stolice pacijenata u odnosu na uzorke iz hrane i okoline. Samo 33,3% izolata iz stolice pacijenata su pokazali osetljivost na tetraciklin, dok su 100% bili osetljivi na trimetoprim-sulfametoksazol. Nasuprot ovim rezultatima, visoka stopa osetljivosti na tetraciklin dobijena je u uzorcima iz okruženja (83.33%) i iz hrane (93.34%), dok je osetljivost na trimetoprim-sulfametoksazol kod uzoraka hrane iznosila 63.33% i 70% kod izolata iz okruženja. Slično našim rezultatima Özcelik i Čitak (2009) potvrdili su rezistentnost na tetraciklin u 6/34 izolata *B. cereus* iz sladoleda, ali Wong i sar. (1988) su pokazali visoku osetljivost na trimetoprim-sulfametoksazol (78%) i malu osetljivost na tetraciklin (19%) kod uzoraka iz mlečnih proizvoda. Otpornost na tetraciklin kod svih ispitanih sojeva *B. cereus* iz uzoraka hrane sa ulica, potvrdili su Oladipo i Adejumobi (2010). Aslim (2002) ističe

visoku osetljivost na tetraciklin (93%) kod uzoraka iz zemljišta, dok Luna i sar. (2007) pokazuju 100% osetljivost na ovaj antibiotik u uzorcima iz životne sredine. Međutim, isti autori ukazuju i na visoku osetljivost prema trimetoprim-sulfametoksazol (74%) u ispitivanim uzorcima.

Iako smo mi utvrdili jasnu razliku u osetljivosti na tetraciklin i trimetoprim-sulphamethoksazol u uzorcima stolice pacijenata, Weber i sar. (1988), pri sumnji na bakterijemiju testirali su uzorake krvi pacijenata i dobili drugačije rezultate u osetljivosti na ove antibiotike. U našoj studiji, osetljivost na trimetoprim-sulfametoksazol je pronađena u 100% uzoraka i 33,3% na tetraciklin, ali Weber i sar. pokazali su 100% rezistentnost na trimetoprim-sulfametoksazol i 59% osetljivost na tetraciklin.

Postavlja se pitanje: Odakle prisustvo visoke rezistencije na tetracikline u uzorcima iz stolice pacijenta?

Poznato je da rezistencija na tetraciklin nastaje kroz tri mehanizma: produkcija proteina koji se vezuju za ribozom i štite ga, aktivno izbacivanje antibiotika iz ćelije pomoću pumpe ili degradacija antibiotika (Chopra and Roberts, 2001). Međutim, bez obzira na njen nastanak, širenje rezistencije je brzo. Tome svakako doprinosi nekontrolisana upotreba antibiotika u poljoprivredi i prehrambenoj industriji, dovodeći do favorizovanja otpornih sojeva bakterija u zemljištu, a kroz lanac ishrane njihov prenos do drugih domaćina. Međutim, i nekontrolisana upotreba antibiotika kod pacijenata može da bude uzrok povećanja rezistencije na antibiotike, prenošenjem gena rezistencije među bolesnicima. U oba slučaja radi se o prisustvu horizontalnog transfera gena za rezistenciju na antibiotike iz crevnih bakterija iz đubriva, u bakterijsku populaciju u zemlji i iz nje do biljaka, životinja i ljudske populacije, kružeći u prirodi.

Kao što smo napomenili, *B. cereus*, od svih vrsta roda *Bacillus* najčešće izaziva alimentarne intoksikacije i toksikoinfekcije kod ljudi. Ova oboljenja su povezana sa konzumiranjem različitih prehrambenih proizvoda, animalnog i biljnog porekla. Kako su spore *B. cereus* termorezistentne, priprema i obrada namirnica ne dovodi do njihovog uništavanja, tako da pri optimalnim fizičko-hemijskim uslovima spore *B. cereus* kličaju i prelaze u vegetativni oblik sa mogućnošću produkcije dve vrste toksina: enterotoksini i

emetični toksin. Oba tipa mogu da imaju ozbiljan efekat na ljudsko zdravlje (Ehling-Schulz i sar., 2006).

Emetični toksin, cereulin je termostabilan i dovodi do pojave emetičnog sindroma koji se kod ljudi manifestuje obilnim povraćanjem. Nakon svega 1-6 sati po konzumiranju kontaminirane hrane javljaju se simptomi, a infekcija traje 24 sata i kraće. Enterotoksini dovode do dijareje i abdominalnih bolova, a inkubacioni period traje između 8-16 sati. Kako enterotoksini nisu stabilni na povišenoj temperaturi, izlaganje i obrada namirnica na visokoj temperaturi uništava toksine, a samim tim onemogućava i razvoj oboljenja (Ehling - Schulz i sar., 2004b; Leuschner 2003; Horwood i sar., 2004; Granum i Baird - Parker, 2000). Pored visoke temperature, kisela sredina želuca omogućava preživljavanje samo spora, koje dolaskom u tanko crevo kličaju, poprimajući vegetativni oblik, sa mogućnošću produkcije toksina. Međutim, najnovija istraživanja Ceuppens i dr. (2012a, d) pokazuju da i vegetativne ćelije mogu da prežive prolazak kroz želudac i dospeju do tankog creva domaćina, proizvode enterotoksine i uzrokuju dijarealnu bolest. Kako god, zbog prijavljenih slučajeva sa smrtnim ishodom (Ehling - Šulc i sar., 2005b) nakon konzumiranja hrane kontaminirane sa emetičnim i enterotoksinima, javila se potreba za praćenjem (monitoringom) prisustva gena za produkciju toksina, kao pokazatelja moguće toksikoinfekcije kod ljudi.

Pored alimentarnih infekcija *B. cereusa* izaziva i čitav niz drugih oboljenja: septični meningitis, endokarditis, celulitis, gangrenu i brojne respiratorne, hiruške i oftalmološke infekcije (Ginsburg sar., 2003). Zbog toga, u okviru sanitarne i kliničke mikrobiologije razvile su se dijagnostičke metode za izolaciju, detekciju i identifikaciju *B. cereus* i njegovih gena koji kodiraju toksine.

Najspecifičnija i najbrža metoda je PCR (Polymerase Chain Reaction), koja omogućava da napravimo razliku između potencijalno patogenih i nepatogenih vrsta *B. cereus*.

Prisustvo gena za enterotoksine (*hbla* i *entFM*), dokazano je PCR analizom upotrebom specifičnog para prajmera za *hbla* gen, kod 29/30 izolata stolice pacijenata, 23/30 izolata iz hrane i kod 24/30 izolata iz okoline, a *entFM* gen kod svih 30 izolata iz stolice pacijenata i iz hrane, a kod 28/30 izolata iz okoline. Prisustvo ova dva specifična gena za kodiranje enterotoksina potvrdili su i mnogi drugi autori i istakli njihov značaj.

Tako su Noortatiny i Sahilah (2013) potvrdili prisustvo oba gena u svim testiranim uzorcima hrane, dok su Vyletelova i Banyko (2010) prisustvo *entFM* gena utvrdili kod svih testiranih uzoraka mleka, a *hbla* gen kod 29/41 istih uzorka. Reis i sar. (2013) takođe potvrđuju značajano prisustvo *hbla* gena kod uzoraka mleka i mlečnih proizvoda. Prisustvo ovih gena kod svih testiranih uzoraka brze hrane potvrdili su i Noortatiny i Sahilah (2013), ističući da se PCR metodom mogu detektovati količine DNK od 0,1 ng/μl i to direktno iz uzoraka hrane. Prisustvo *hbla* i *entFM* gena u uzorcima brze hrane potvrđuju i autori iz Koreje: Chon i sar. (2012) Lee i sar. (2012), a Kim i sar., (2011) u kliničkim i uzorcima iz hrane.

I drugi autori su bili zainteresovani da utvrde prisustvo gena za enterotoksine i u uzorcima stolice pacijenata i iz okruženja. Tako su Kim i sar. (2011) potvrdili visoki procenat ovih gena u uzorcima od pacijenata i hrane, a Banerjee i sar. (2011) prisustvo *hbla* gena kod 25/30 uzorka stolice pacijenata sa simptomima dijareje. Interesantno je da su Al-Khatib i sar. (2007) izolovali *B. cereus* iz 31/325 uzorka stolice pacijenata sa dijarejom, a samo kod 3/165 kontrolna uzorka (pacijenti bez dijareje). Od njih 31, 18 je imalo *hbla* gen tj. 48% je posedovalo sve testirane enterotoksin gene, dok su samo dva izolata iz kontrolne grupe imala gene iz HBL kompleksa. Sva ova istraživanja pokazala su direktnu vezu između prisustva *hbla* i drugih gena iz HBL kompleksa, sa oboljevanjem pacijenata sa simptomima dijareje. Nasuprot tome, prisustvo *entFM* gena ne dovodi se u direktnu vezu sa produkcijom enterotoksina (Das i sar., 2009).

U okviru našeg istraživanja, u grupi okolina od 30 izolata, 12 je bilo iz zemljišta i 18 iz bolničkog okruženja. Nakon testiranja prisustva gena za enterotoksine dobili smo da je *hbla* gen detektovan kod 24/30 uzorka, od toga 10/12 kod uzoraka iz zemljišta i 14/18 uzoraka iz bolničke sredine. Visok procenat (68%) detekcije *hbla* gena kod sojeva *B. cereus* iz zemljišta potvrdili su i Prüß i sar. (1999), ali podatke o prisustvu gena za produkciju enterotoksina kod sojeva iz bolničkog okruženja nismo pronašli. Kako se *B. cereus* dovodi u sve češću vezu sa negastrointestinalnim infekcijama, kontrolisanje prisustva gena za produkciju toksina treba da zauzme značajno mesto kod kontrole intrahospitalnih infekcija.

Pored gena za produkciju enterotoksina, neophodno je praćenje prisustva gena (*cer* gen) za produkciju emetičnog toksina, svojstvenog za *B. cereus* vrstu. Kako se zna

da je to termostabilan toksin, otporan na visoke temperature i različite hemijske tretmane, njegovo dokazivanje u sirovoj ili obrađenoj hrani je od velikog značaja. Naši rezultati su pokazali da je gen za ovaj toksin prisutan kod svih sojeva *B. cereus* izolovanih iz stolice pacijenata, a kod 28/30 i 25/30 izolata iz uzoraka hrane i okoline. Prisustvo *cer* gena u svom radu testirali su Kim i sar. (2010, 2013) dokazujući prisustvo ovog gena kod 36/81 kliničkih izolata, kod jednog od 65 izolata iz semena i kod tri od 11 izolata iz hrane. Njihov rad nas je naveo da u našem radu koristimo *cer* gen umesto *ces* gena za detekciju prisustva gena za emetični toksin, jer su na osnovu različitih PCR metoda, dokazali visoku senzitivnost i specifičnost *cer* gena, u odnosu na *ces* gen koji je pokazao visoku specifičnost, ali nisku senzitivnost. Stoprocentno prisustvo *cer* gena kod izolata iz stolice pacijenata može se dovesti u direktnu vezu sa obolevanjem pacijenata čije smo uzorke testirali, a njegovo visoko prisustvo kod uzora iz hrane i okoline kao znak za visoki stepen opasnosti od oboljenja kod ljudi.

Od velike važnosti je istaći da se kod velikog broja izolata *B. cereus* kako iz uzoraka pacijenata, tako i hrane i okoline detektovalo prisustvo sva tri testirana gena: *hbla*, *entFM* i *cer* gena (29/30, 22/30, 21/30). Isto tako, napominjemo da kod izolata koji nisu imali detektovan *hbla* gen iz sve tri ispitivane grupe (jedan iz stolice, šest iz hrane, tri iz okoline) imali smo detektovan *entFM* i *cer* gen. Tako da su dobijeni rezultati sa jedne strane u skladu sa autorima u čijim rezultatima je potvrđeno prisustvo *entFM* gena, a radi se o emetogenim sojevima (Chon i sar., 2012). S druge strane visoki procenat istovremenog prisustva *hbla* i *cer* gena kod istog soja dokazanih u našoj studiji, razlikuje se od pomenutih autora koji su samo kod jednog emetogenog soja utvrdili prisustvo *hbla* gena, a u skladu sa njima su i rezultati Rahmati i Labbe (2008) i Kim i sar. (2010b).

Za razliku od enterotoksina za koji postoje komercijalni testovi za detekciju i produkciju ovih toksina, za emetični toksin ne postoji ovakva vrsta testova i zbog toga rezultati dobijeni PCR metodom su od krucijalnog značaja. Isto tako, bez obzira na komercijalne testove za prisustvo i produkciju enterotoksina (BCET-RPLA), i međusobnog poklapanja u rezultatima mnogih autora (Hansen i Hendriksen, 2001; Ghelardi sar., 2002; Guinebretere i sar., 2002; Das i sar., 2009; Vyletelova i Banyko, 2010; Reis i sar., 2013), prednost se daje PCR zbog brzine dobijanja rezultata (par sati) i

osetljivosti testa, gde se minimalna količina DNK može detektovati, za razliku od testova aglutinacije za koji je potrebna određena količina toksina i najmanje dva dana da se dobije rezultat. Preporuka Vyletelova i Banyko (2010) je da se koriste obe metode kako bi se utvrdilo prisustvo gena za enterotoksine i njegova aktivnost.

Visoka prevalenca gena za toksine u uzorcima iz hrane i okoline, ukazuje na potencijalni rizik za ljudsko zdravlje.

Poznato je da *B. cereus* proizvodi β -hemolizu na 5% ovčijem defibrinisanom agaru i da je to osobina po kojoj se on razlikuje od *B. anthracis*. Smatra se da je prisustvo HBL kompleksa gena odgovorno za ovu osobinu. Međutim, mnogi autori (Mantynen i Lindstrom, 1998; Al-Khatib i sar., 2007; Banerjee i sar., 2011) su pokazali da se prisustvo *hbla* gena ne podudara sa produkcijom hemolize. I naši rezultati su pokazali da iako smo imali produkciju β -hemolize kod svih ispitanih sojeva *B. cereus*, prisustvo *hbla* gena nije dokazano kod 14 sojeva. Nasuprot tome, Hsieh i sar. (1999) i Das i sar. (2009) potvrđuju prisustvo *hbla* gena kod svih sojeva koji su proizveli β -hemolizu na krvnom agaru. Međutim, bez obzira na razlike u rezultatima, testiranje prisustva *hbla* gena (i drugih gena iz HBL kompleksa) i utvrđivanje prisustva β -hemolize su važni dijagnostički parametri i potrebno ih je pratiti kod sojeva *B. cereus*.

Jedan od zadataka postavljenih u ovom radu bio je i određivanje genskog profila izolovanih sojeva *B. cereus* i njihovo međusobno upoređivanje. Karakterizacija izolata pomoću RAPD analize omogućila je formiranje klastera u kojima se nalaze blisko srodni izolati. Potvrđeno je da se ova metoda koristi za gensko mapiranje u taksonomskim i filogenetskim studijama kod mnogih organizama (Danylchenko i Sorochinsky, 2005). Isto tako, ovaj metod se uspešno primenjuje za diferenciranje, karakterisanje *Bacillus* vrsta (*B. cereus*, *B. thuringiensis* i *B. mycooides*) (Jiyeon i sar., 2011; Oh i sar., 2012). U svom radu Jiyeon i sar. su primenom RAPD analize, amplifikacijom sa određenim prajmerom, uspeli da razlikuju *B. cereus* od *B. subtilis*, jer se kod svih sojeva *B. cereus* grupe među dobijenim trakama RAPD profila nalazila i traka od 0,91 kb. Na osnovu preliminarnih rezultata, autori su smatrali da će na sličan način moći da razlikuju pojedine vrste unutar *B. cereus* grupe. U zavisnosti od prajmera koji su primenili za RAPD analizu, Oh i sar. su pomoću jednog prajmera dobili grupisanje *B. mycooides*

izolata u odvojenu grupu u odnosu na *B. cereus* i *B. thuringiensis*. Neki izolati *B. cereus* su isto bili grupisano odvojeno, a neki zajedno sa *B. thuringiensis*. Ni drugi autori nisu uspeli da primenom RAPD analize dobiju grupisanje sojeva *B. cereus* grupe po vrstama, čak ni kada su tu analizu kombinovali sa podacima o produkciji enterotoksina (Martínez-Blanc i sar., 2011). Svoj pristup predlažu za ispitivanje kontrole kvaliteta u industriji hrane. Takođe, RAPD analiza može se koristiti za detekciju promena DNK nakon delovanja mnogih genotoksičnih agenasa (Atienzar i sar., 2002). Kao poseban značaj ove metode ističe se njena upotreba za karakterizaciju i monitoring sojeva *B. cereus*, kako u okruženju, tako i u kliničkim epidemiološkim istraživanjima kod obolelih usled trovanja hranom.

Za karakterizaciju izolata *B. cereus* korišćena je RAPD analiza, upotrebom dva prajmera: SPH1 i AG15. Dobijeni rezultati omogućili su tipiziranje svih ispitivanih uzoraka, kako unutar grupa (izolata stolice pacijenata, hrane, okoline) tako i između grupa. Na osnovu profila dobijenih amplifikacijom pomoću oba prajmera izrađeni su zbirni dendrogrami.

Prema zbirnom RAPD dendogramu dobijenom nakon testiranja izolata iz stolice pacijenata formirana su dva klastera sa razlikom od 68%, iz izolata hrane dva klastera sa razlikom od 55% i iz izolata iz okoline takođe dva klastera sa međusobnom razlikom od 61%. Osim klastera II kod dendograma iz okoline koji je imao tri subklastera, svi ostali klasteri su se delili na dva subklastera sa po dve grane.

Analizirajući dobijene dendograme RAPD analizom sa oba prajmera unutar svake grupe *B. cereus* izolata utvrđena je velika heterogenost izolata. Na nivou sličnosti od 80% izdvojilo se sedam izolata iz grupe stolice pacijenata i po 13 izolata iz grupe hrane i okoline. Ovaj rezultat ukazao nam je na veću sličnost među izolatima unutar grupe sojeva od pacijenata u odnosu na izolate iz hrane i okoline, što nas navodi na pretpostavku da je poreklo infekcije kod pacijenta bilo isto tj. da su možda konzumirali istu hranu na istom mestu. Međutim, kako nam ti podaci nisu dostupni, ostaje nam da u budućem radu prilikom primanja uzorka stolice od pacijenata, beležimo eventualni izvor zaraze.

Ističemo, da su se ovi izolati koristili za upoređivanje izolata iz različitih grupa RAPD analizom i tom prilikom formiran je zbirni dendrogram odabranih sojeva iz sve tri grupe. Na dobijenom dendogramu uočavaju se dva klastera sa razlikom od 61% i tri

subklastera kod klastera II i dva subklastera kod klastera I. Klaster I imao je 11 izolata, a klaster II 25 izolata među kojima je bio i ATTC soj. Ono što se moglo uočiti je da na nivou klastera nije došlo do grupisanja uzoraka u odnosu na poreklo tj. i u klasteru I i u klasteru II bili su uzorci iz sve tri grupe: stolice pacijenata, hrane, okoline. Međutim, na nivou subklastera klastera I, na razlici od 50%, došlo je do grupisanja uzoraka, tako da su u okviru subklastera 1 bili izolati iz stolice pacijenata i okoline, a u subklasteru 2 sojevi *B. cereus* iz sve tri grupe. Isto tako, u okviru klastera II na nivou razlike od 45%, u okviru subklastera 1 našla su se samo dva izolata iz stolice pacijenata, u subklasteru 2 tri izolata iz hrane i jedan iz okoline, a subklaster 3 sadržavao je 20 izolata, od kojih su dva bila iz stolice pacijenata, a ostali iz hrane i okoline. Prisustvo izolata iz sve tri ispitivane grupe u oba klastera i na nivou pojedinih subklastera ukazuje na široku rasprostranjenost genski sličnih vrsta *B. cereus*.

Potvrdu velike genske heterogenosti među sojevima *B. cereus* upotrebom RAPD analize utvrdili su Prasad i sar. (2014) upoređujući prisustvo ove bakterije kod riba iz tropskih mora. Na dobijenom dendrogramu utvrđena je razlika među sojevima od 85.71% i 56.25% na osnovu dva prajmera.

Slično tome, upoređujući kliničke izolate *B. cereus* i iz hrane Kim i sar., (2011) utvrdili su veću raznovrsnost RAPD profila kod izolata iz stolice nego kod uzoraka iz hrane. Tako da su se u okviru dendrograma uzorci hrane nalazili u okviru dve grupe, a klinički uzorci stolice pacijenata u sedam grupa. Na nivou sličnosti od 70% RAPD analizom dobijeno je 17 odvojenih RAPD profila, što ukazuje na veliku heterogenost među izolatima.

Interesantno je napomeniti da su Ghelardi i sar. (2002) koristili RAPD analizu za karakterizaciju *B. cereus* izolovanih iz obolelih i uzoraka hrane, koja se služila na dve svečanosti. Nakon njihovog konzumiranja 173 osobe su imale simptome intoksikacije. Sa nekoliko pojedinačnih prajmera, između sojeva *B. cereus* su detektovane samo zanemarljive razlike u RAPD profilu. To je ukazivalo na klonalnost između izolata iz pacijenata i iz hrane i na taj način je potvrđen izvor kontaminacije kod ova dva trovanja hranom. Autori preporučuju primenu PCR amplifikacije gena koji kodiraju toksine u kombinaciji sa RAPD ili multipleks RAPD tipizacijom za potvrdu izvora infekcije i praćenje kako kliničkih, tako i izolata *B. cereus* iz okoline.

Međutim, RAPD analiza je metod koji daje visoki stepen razlikovanja između vrsta, posebno kada je potreban brzi skrining velikog broja vrsta *B. cereus* (Nilsson i sar., 1998).

Naši rezultati dobijeni RAPD analizom sa jednim prajmerom pokazali su veliku heterogenost među izolatima, pa se uz tog razloga radila zbirna RAPD sa oba prajmera prema njihovoj sličnosti od 80%. Ovaj rezultat je ukazao na veliku gensku razliku među sojevima *B. cereus* unutar ispitivane grupe, a sa druge strane prisustvo izolata i iz stolice pacijenata, hrane i okoline nakon zbirne RAPD analize u istim klasterima na sličnost među sojevima ispitivanih grupa. Drugim rečima, prisustvo izolata iz sve tri grupe u istom klasteru ukazuje nam na mogućnost postojanja sličnih sojeva i u okolini, zemljištu, hrani i stolici pacijenata, što je u skladu sa kruženjem sojeva u prirodi kroz lanac ishrane.

7. ZAKLJUČCI

1. Primenom klasičnih, biohemijskih i molekularnih metoda iz uzoraka stolice pacijenata (62), hrane (40) i okoline (146), izolovano je i identifikovano po 30 sojeva *B. cereus*.
2. Ispitivanjem osetljivosti sojeva *B. cereus* na antibiotike disk-difuzionom metodom utvrđena je velika osetljivost na većinu testiranih antibiotika kod sojeva *B. cereus* izolovanih iz sve tri grupe. Značajno manja osetljivost detektovana je na tetraciklin kod sojeva izolovanih iz stolice pacijenata i na trimetoprim-sulfametoksazol kod sojeva iz hrane i okoline.
3. Kod svih testiranih izolata *B. cereus* utvrđena je rezistencija izolata na cefalosporine treće generacije, penicilin i ampicilin, pomoću metoda za otkrivanje produkcije cefalosporinaze i penicilinaze: metoda dvostrukog diska i nitrocefinski test.
4. PCR analizom, utvrđeno je prisustvo gena za emetični toksin kod svih sojeva *B. cereus* izolovanih iz stolice pacijenata, kod 28/30 i 25/30 izolata iz uzoraka hrane i okoline.
5. Prisustvo gena za enterotoksine (*hbla* i *entFM*) u našem istraživanju, nakon PCR analize, dokazano je upotrebom specifičnog para prajmera za *hbla* gen kod 29/30 izolata stolice pacijenata, 23/30 izolata iz hrane i 24/30 izolata iz okoline, a *entFM* gen kod svih 30 izolata iz stolice pacijenata i iz hrane, a kod 28/30 izolata iz okoline.
6. Prisustvo sva tri testirana gena za toksine (*hbla*, *entFM* i *cer*) detektovano je kod velikog broja izolata *B. cereus* u sve tri ispitivane grupe (29/30, 22/30, 21/30).

7. Učestalost gena za toksine u uzorcima iz hrane i okoline, implicira na potencijalno visok rizik za ljudsko zdravlje.
8. Karakterizacija izolata pomoću RAPD analize, ukazala je na veliku heterogenost tj. veliku gensku razliku među izolatima unutar ispitivane grupe.
9. Nakon zbirne RAPD analize odabranih sojeva iz sve tri grupe, sa oba prajmera, utvrđeno je prisustvo izolata i iz stolice pacijenata, hrane i okoline u istim klasterima, što ukazuje na mogućnost postojanja sličnih sojeva i u okolini, zemljištu, hrani i stolici pacijenata, u skladu sa njihovim kruženjem u prirodi kroz lanace ishrane.

Na osnovu definisanih ciljeva i dobijenih rezultata istraživanja, jasno je da je postavljena hipoteza potvrđena.

8. LITERATURA

1. **Abdel-Shakour EH**, Roushdy MM. Plasmid Profile and Protease Activity of β -lactams Resistant Termotolerant Soil Isolate *B. cereus* BC2 from the *Bacillus cereus* Group Species. *Rep Opinion* 2010; 2: 82-94.
2. **Abriouel HB**, Omar NL, Lopez RM, Canamero M, Ortega E, Galvez A. Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto and degue, two traditional cereal-based fermented foods of Burina Fasoand Republic of Congo. *J Food Prot* 2007; 70: 1165-1173.
3. **Agata N**, Mori M, Ohta M, Sathorn S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation In Hep-2 Cells. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 121: 31-34.
4. **Agata N**, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptid, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 129: 17-20.
5. **Agata N**, Ohta M, Mori M, Suwan S, Ohtani I. A novel dodecadepsipeptid, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 121: 31-34.
6. **Agata N**, Ohta M, Mori M. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology* 1996; 33: 67-69.
7. **Agata N**, Ohta M, Mori M, Shibayama K. Growth conditions of an emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiol Immunol* 1999; 43:15-18.
8. **Agata N**, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol* 2002; 73: 23-27.

9. **Agersø Y**, Jensen LB, Givskov M, Roberts MC The identification of a tetracycline resistance gene *tet* (M), on a Tn916-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 214: 251-6.
10. **Alkhatib MS**, Khyami-Horani H, Badran E, Shehabi A. Incidence and Characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 383-7.
11. **Andersson MA**, Hakulinen P, Honkalampi-Hämäläinen U, Hoornstra D, Lhuquenot JC, Mäki-Paakkanen J et al. Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicolon* 2007; 49: 351-367.
12. **Andersson MA**, Mikkola R, Helin J, Andersson MC, Salkinoja-Salonen M. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1338-1343.
13. **Apetroaie C**, Andersson MA, Spröer C, Tsitko I, Shaheen R, Jääskeläinen EL et al. Cereulide producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. *Arch Microbiol* 2005; 184:141-151.
14. **Aslim B**. Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. *Turk J Biol* 2002; 26: 41-8.
15. **Atienzar FA**, Venier P, Jha AN, Depledge MH. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2002; 521: 151–163.
16. **Auger S**, Galleron N, Bidnenko E, Ehrlich SD, Lapidus A, Sorokin A. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is

- representative of a cluster of thermophilic strain. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1276-1280.
17. **Banerjee M**, Nair GB, Ramamurthy T. Phenotypic & genetic characterization of *Bacillus cereus* isolated from the acute diarrhoeal patients. *Indian J Med Res* 2011; 133: 88-95.
 18. **Barker M**, Thakker B, Priest FG. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245: 179-186.
 19. **Baron EJ**, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic Microbiology. 9th ed. New York, Mosby-Year-Book: 958, 1994.
 20. **Bazzicalupo M**, Fani R. The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms. *Methods Mol BioE* 1996; 50: 155-175.
 21. **Beattie SH**, Williams AG. Detection of toxins. In Encyclopedia of Food Microbiology (vol 1). Edited by Robinson R. K., Batt C. A. and Patel P.D. Academic Press, San Diego, USA. pp: 141-149. 2000.
 22. **Beecher DJ**, Wong ACL. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (12): 4614-4616.
 23. **Beric T**, Urdaci CM, Stankovic S, Knezevic-Vukcevic J. RAPD Analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. *Arch Biol Sci* 2009; 61: 545-652.
 24. **Bottone EJ**. *Bacillus cereus*, A Volatile Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2010; p. 382-398.

25. **Brown CS**, Chand MA, Hoffman P, Woodford N, Livermore DM, Brailsford S, et al. Possible contamination of organ preservation fluid with *Bacillus cereus*: the United Kingdom response. *Euro Surveill* 2012; 17(18): 20165.
26. **Buffet-Bataillon S**, Branger B, Cormier M, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities. *J Hosp Infect* 2011; 79: 141-146.
27. **Carlin F**, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salkinoja-Salonen M, et al. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int Food Microbiol* 2006; 109: 132-138.
28. **Ceuppens S**, Boon N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol* 2013; 84: 433-450.
29. **Ceuppens S**, Uyttendaele M, Drieskens K, Rajkovic A, Boon N, Van de Wiele T. Survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores during *in vitro* simulation of gastric passage. *J Food Prot* 2012b; 75: 690-694.
30. **Chon JW**, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Seo K-H. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol* 2012; 32: 217-222.
31. **Chon JW**, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Song KY, Park C, Seo K-H. Prevalence, phenotypic traits and molecular characterization of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strain isolated from human stools in Korea. *J Appl Microbiol* 112: 1042-1049.

-
32. **Chopra L**, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 232-60.
 33. **CLSI Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline M-45**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006.
 34. **CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.
 35. **Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance**. Codex Alimentarius Commission (CAC). Rome: CAC. 2011.
 36. **Collins CH**, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. London: Arnold. 2001.
 37. **Cordero OX**, Wildschutte H, Kirkup B, Proehi S, Ngo L, Hussain F. et al. Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* 337, 1228-1231. doi: 10.1126/science.1219385. 2012.
 38. **Cormican M**, Moris D, Corrbet-Feenney G. Extended spectrum-lactamase production and community asquired urinary tract infection. *Diagn Microbiol Inf Dis* 1998; 32:377-379.
 39. **Courvalin P**. Antimicrobial drug resistance: Production is very difficult, especially about the future. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(10).

40. **Cronin UP**, Wilkinson MG. The use of flow cytometry to study the germination of *Bacillus cereus* endospores. *Cytometry part A* 2007; 71A: 143-153.
41. **Cuppens S**, Rajkovic A, Hamelink S, Van de Wiele T, Boon N, Uyttendaele M. Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne Pathog Dis* 2012a; 9: 1130-1136.
42. **Danylchenko O**, Sorochinsky B. Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV- and γ -rays. *BMC Plant Biology* 2005; 5: S9.
43. **Das S**, Surendran PK, Thampuran N. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. *Indian J Med Res* 2009; 129: 316-320.
44. **D'Costa VM**, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C. et al. Antibiotic resistance in ancient. *Nature* 477: 457-461. doi: 10.1038/nature 10388. 2011.
45. **Dierick R**, van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt H, Devlieger A, Meulemans A, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* - associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4277-4279.
46. **Duc LH**, Dong TC, Logan NA, Sutherland AD, Taylor J, Cutting SM. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. *Inter J Food Microbiol* 2005; 102: 245-251.
47. **EFSA**. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EPFA J* 2012; 10: 2597.

48. **Ehling-Schulz M**, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 232: 189 -195.
49. **Ehling-Schulz M**, Fricker M, Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 2004b; 48: 479-487.
50. **Ehling-Schulz M**, Guinebretiere MH, Monthan A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 260: 232-240.
51. **Ehling-Schulz M**, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindback T, Andersson M, Schulz A, et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 2005b; 151: 183-197.
52. **Ehling-Schulz M**, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Martlbauer E, Scherer S. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2005a; 71: 105-113.
53. **EUCAST** guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. December 2013.
54. **European Commission**. Council Directive 93/88/EEC modifying Directive 90/697/EEC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents to work. Official Journal of European Communion. L268 of 29.10.1993, pp: 71-82. 1993.

55. **Fagerlund A**, Brillard J, Furst R, Guinebretiere MH, Granum PE. Toxin production in rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology* 2007; 7: 43.
56. **Fagerlund A**, Lindback T., Storset AK, Granum PE, Hardy SP. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of hemolysing, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 2008; 154: 693-704.
57. **Fagerlund A**, Ween A, Lund T, Hardy SP, Granum PE. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 2004; 150: 2689-2697.
58. **Finlay WJ**, Logan NA, Sutherland A. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1811-1812.
59. **Finlay WJ**, Logan NA, Sutherland AD. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 385-389.
60. **Forsythe SJ**. Basic aspects. In: The microbiology of safe food. Blackwell Science. Edited by Forsythe S. MA, USA, pp: 10-52. 2000.
61. **Fricke M**, Messelhäuser, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M. Diagnostic real-time PCR assay for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1892-1898.
62. **Ghelardi E**, Celandroni F, Salvetti S, Barsotti C, Baggiani A, Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208: 129-134.

-
63. **Ginsburg AS**, Salazar LG, True LD., Dists ML. Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenicenterocolitis during the treatment of acute leukemia. *Am J Hematol* 2003; 72: 204-208.
64. **Godič Torkar K**, Smole Možina S. Determination of *Bacillus cereus* and its toxins from milk and milk products. *Period Biol* 2001; 2: 169-173.
65. **GodičTarkar K**, Seme K. Antimicrobial Susceptibility, β -Lactamase and Enterotoxin Production in *Bacillus cereus* Isolates from Clinical and Food Samples. *Folia Microbiol* 2009; 54(3): 233-8.
66. **Gohar M**, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Økstad OA, Gominet M. et al. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3: e2793. 2008.
67. **Granum EP**, Nissen H. Sphingomyelinase is part of the enterotoksin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 110: 97-100.
68. **Granum PE**, Baird-Parker TC. *Bacillus* species. V: The microbiological safety and quality of food. Lund B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.W. (eds.). Maryland, Aspen Publishers: 1029-1039. 2000.
69. **Granum PE**, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 157: 223-228.
70. **Granum PE**. *Bacillus cereus* and food poisoning. In Applications and systematics of *Bacillus* and relatives, edited by Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N. and De Vos P. Blackwell publishing company. MA, USA. pp: 37-46. 2002.

71. **Granum PE.** *Bacillus cereus*. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3 rd ED. Edited by Doyle M. and Beuchat L. 3rd Edition, ASM Press, Washington, D.C. pp: 445-456. 2007.
72. **Griffiths MW,** Schraft H. *Bacillus cereus* food poisoning. In Foodborne diseases, edited by Clicer DO and Riemann HP Academic press, California USA, pp: 261-270. 2002.
73. **Guinebrețičre MH,** Broussolle V, Nguyen-The N. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3053-3056.
74. **Guinebrețičre MH,** Fagerlund A, Granum PE, Nguyen-The C. 2006. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol Lett* 259: 74-80.
75. **Hägglom MM,** Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under different conditions. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2479-2483.
76. **Hansen BM,** Hendriksen NB. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strain by PCR Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 185-189.
77. **Helgason E,** Caugant DA, Olsen I, Kolstø AB. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J Clin Microbiol* 2000a; 38: 1615-1622.
78. **Helgason E,** Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, ET AL. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*- one species on basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2627-2630.

-
79. **Helgason E**, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 2000c; 66: 2627-2630.
80. **Helgason E**, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolstø AB. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 191–201.
81. **Henriques AO**, Moran CP. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Ann Rev Microbiol* 2007; 61: 555-588.
82. **Holmes JR**, Plunkett T, Pate P, Roper WL, Alexander WJ. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Arch Inter Med* 1981; 141: 766-767.
83. **Holt JG**, Frieg NR, Sneath PHA, Staley ST, Williams ST. Genus *Bacillus*. In Bergey's manual: Determinative bacteriology 9th edition. Edited by Hensyl W.R. Baltimore, USA Williams & Wilkins. pp: 559-564. 1994.
84. **Hornstra LM**, de Leeuw PL, Moezelaar R., Wolbert EJ, de Vries YP, de Vos WM, Abee T. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 367-371.
85. **Hornstra LM**, de Vries YP, de Vos W.M, Abee T. Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3746-3749.
86. **Horwood PF**, Burgess GW, Oakey HJ. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 319-324.

-
87. **Horwood PF**, Burgess GW, Oakey HJ. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 319-24.
 88. **Hsieh M**, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 481–490.
 89. **Hu X**, Swiecicka I, Timmerly S, Mahillon J. Sympatric soil communities of *Bacillus cereus sensu lato*: population structure and potential plasmid dynamics of pXO1- and pXO2-like element. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; 70: 344-55.
 90. **Hughes S**, Bartholomew B, Hardy JC, Kramer JM. Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol Lett* 1988; 52: 7-11.
 91. **Ivanova N**, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B. et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 2003; 423: 87-91.
 92. **Jääskeläinen E**. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. Academic dissertation in Microbiology. University of Helsinki, Finland. 2008.
 93. **Jackson PJ**, Hill KK, Laker MT, Ticknor LO, Keim P. Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 263-269.

-
94. **Jay JM**, Loessner MJ, Golden DA. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Modern food microbiology, 7th edition, Springer Science+Business media, Inc., New York, USA pp: 583-590. 2005.
95. **Jensen GB**, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Mini Rev Environ Microbiol* 2003; 5: 631-640.
96. **Jensen LB**, Baloda S, Boye M, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environ Int* 2001; 26: 581-7.
97. **Jiyeon L**, Kwon G-H, Park J-Y, Park C-S, Kwon DY, Lim J, et al. A RAPD-PCR Method for the Rapid Detection of *Bacillus cereus*. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21: 274-276.
98. **Keim P**, Kalif A, Schupp J, Hill K, Travis SE, Richmond K. et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 1997a; 179: 818-824.
99. **Kim GH**, Forghani F, Oh D-H. Rapid detection of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strain using triple-primer polymerase chain reaction (PCR) assay. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7(8): 620-625.
100. **Kim JB**, Kim JM, Cho SH, Oh HS, Choi NJ, Oh DH. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *J Food Science* 2011; 76: T25-T29.
101. **Kim JB**, Kim JM, Kim CH, Seo KS, Park YB, Choi NJ, Oh DH. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2010b; 144: 182-186.

-
102. **Kim JB**, Kim JM, Park YB, Han JA, Lee SH, Kwak HL, et al. Evaluation of Various PCR Assay for Detection of Emetic-Toxin-Producing *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20: 1107-1113.
103. **Kim JB**, Park J-S, Kim M-S, Hong S-C, Park J-H, Oh DH. Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Inter J Food Microbiol* 2011; 150: 66-72.
104. **Kolstø AB**, Lereclus D, Mock M. Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 264: 95-108.
105. **Kolstø AB**, Tourasse NJ, Økstad OA. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol* 2009; 63: 451-476.
106. **Kramer JM**, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Foodborne Bacterial Pathogens. ed. Doyle, M.P. Marcel Decker, New York, pp: 22-70. 1989.
107. **Lapidus A**, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Segurens B, Dossat C. et al. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact* 2008; 171: 236-249.
108. **Lee N**, Sun JM, Kwon KY, Kim HJ, Koo M, Chun HS. Genetic Diversity, Antimicrobial Resistance and Toxigenic Profiles of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Sunsik. *J Food Prot* 2012; 2: 216-418.
109. **Leuschner R**. *Bacillus*.V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 356-371. 2003.
110. **Luna VA**, King DS, Gullede J, Cannons AC, AmusoPhT, Cattani J. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus*

- pseudomycooides* and *Bacillus thuringiensis* 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and E test agar gradient diffusion methods. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 555-67.
111. **Lund T**, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 2000; 38: 254-261.
112. **Lund T**, Granum PE. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 141: 151-156.
113. **Lund T**, Granum PE. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 1997; 143: 151-156.
114. **Mahler H**, Pasi A, Kramer J, Schulte P, Scoging A, Baer W, Kraehenbuehl S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England J Med* 1997; 336: 1143-1148.
115. **Mäntynen V**, Lindström K. A Rapid PCR-Based DNA Test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:1634-1639.
116. **Martinez-Blanch JF**, Sánchez G, Garay E, Aznar R. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011; 99: 697-709.
117. **McKillip JL**. Prevalence and expresion of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 77: 393-399.

118. **Mignot T**, Couture-Tosi E, Mesnage S, Mock M, Fouet A. *In vivo Bacillus anthracis* gene expression requires PagR as an intermediate effector of the Atx signaling cascade. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 619-624.
119. **Mikkola R**, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *European J Biochem* 1999; 263: 112-117.
120. **Moravek M**, Buerk C, Broussolle V, Guinebretiere MH, Granum PE., Nguyen-The C, Märtlbauer E. Determination of the toxin potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 57: 293-298.
121. **Mortimer PR**, McCann G. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* 1974; 1(7865): 1043-1045.
122. **NCBI website**, 2008, www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/157
123. **Nilsson J**, Svensson B, Ekelund K, Christiansson A. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Lett Appl Microbiol* 1998; 27: 168-172.
124. **Nishikawa Y**, Kramer JM, Hanaoka M, Yasukawa A. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *Int J Food Microbiol* 1996; 31: 149-159.
125. **Niskanen T**, Johansson T, Kuusi M, Raahenmaa M, Siitonen A, Tuominen P. Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2005. *Eviran julkaisuja* 2/2006 sivut: 17-27. 2006.

126. **Niskanen T**, Johansson T, Siitonen A, Kuusi M. Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2006. *Eviran julkaisu* 21/2007 sivut: 15-28. 2007.
127. **Nooratiny I**, Sahilah AM. Detection of enterotoxin targeted entFM and hblA genes by inoculating *Bacillus cereus* (Strain BC1) into ready-to-eat food and drink samples using polymerase chain reaction (PCR). *Int Food Res J* 2013; 20: 1895-1899.
128. **Oh M-H**, Ham J-S, Cox JM. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Inter J Food Microbiol* 2012; 152: 1-8.
129. **Økstad OA**, Kostø AB. Genomics of *Bacillus* Species. Chapter 2. Wiedmann M, Zhang W (eds.) *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens, Food Microbiology and Food Safety*, DOI 10.1007/978-1-4419-7686-4_2. Springer Science+Business Media. 2011.
130. **Oladipo IC**, Adejumobi OD. Incidence of Antibiotic Resistance in Some Bacterial Pathogens from Street Vended Food in Ogbomoso, Nigeria. *Park J Nutr* 2010; 9(11): 1061-8.
131. **Özcelik B**, Citak S. Evaluation of antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolates in ice-cream samples sold in Ancara. *Turk J Pharm Sci* 2009; 6(3): 231-8.
132. **Ozkocaman V**, Ozcelik T, Ali R, Ozkalemkas F, Ozkan A, Ozakin C. et al. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *J Hosp Infect* 2006; 64: 169-176.
133. **Paananen A**, Mikkola R, Sareneva T, Matikainen S, Hess M, Andersson MA. et al. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 420-428.

-
134. **Palman A.** Toksigenost sevov bakterije vrste *Bacillus cereus* iz živil Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd.za živilstvo. 2006.
135. **Pirttijärvi T.** Contaminant aerobic sporeforming bacteria in the manufacturing processes of food packaging board and food. Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis 14/2000. Ph.D. thesis, University of Helsinki, Finland. 2000.
136. **Pirttijärvi TS, Andersson MA, Scoging AC, Salkinoja-Salonen MS.** Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst Appl Microbiol* 1999; 22: 133-144.
137. **Prasad MP.** Molecular characterization of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* species isolated from tropical marine fishes using RAPD markers. *Int J Pure App Biosci* 2014; 2(4): 189-195.
138. **Priest FG.** Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and Gram-positive bacteria – Biochemistry, physiology, and molecular genetics. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R. (eds.) ASM press, American Society for Microbiology, Washington, D. C. ISBN 1-55581-053-5. 1993.
139. **Primorse SB, Twyman RM.** Principles of gene manipulation and genomics. Seventh Edition. Blackwell Publishing, Malden, USA, pp 380. 2006.
140. **Prüss BM, Dietrich R, Nibler B, Märtebauer E, Scherer S.** The hemolytical enterotoxin. HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Bacteriol* 1999; 65: 5436- 5442.

-
141. **Prüß BM**, Dietrich R, Nibler B, Martilbauer E, Scherer S. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5436-5442.
142. **Rahmati T**, Labbe R. Levels and Toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from Retail Seafood. *J Food Prot* 2008; 6: 1108-1308
143. **Rajkovic A**, Uyttendaele M, Deley W, Vansoom A, Rijsselaere T, Debevere J. Dynamic of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide) *J Microbiol Methods* 2006a; 65: 525-534.
144. **Rajkovic A**, Uyttendaele M, Ombregt SA, Jääskeläinen E, Salkinoja-Salonen M, Debevere J. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *J Food Prot* 2006b; 69: 847-852.
145. **Rasko DA**, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FAMS Microbiol Rev* 2005; 29: 303-329.
146. **Rasko DA**, Rosovitz MJ, Okstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J Bacteriol* 2007; 189: 52-64.
147. **Reis ALS**, Montanhini MTM, Bittencourt JVM, Destro MT, Bersot LS. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. *Brazilian J Microbiol* 2013; 44: 1195-1198.
148. **Richards V**, van der Auwera P, Snoeck R, Daneau D, Meunier F. Nosocomial bacteriemias caused by *Bacillus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 783-785.

149. **Riesenfeld CS**, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are the reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2004; 6: 981-989.
150. **Roberts TA**, Baird-Parker AC, Tompkin RB. *Bacillus cereus*. In: Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specification of Food Pathogens. Blackie Academic & Professional 1996 Great Britain. pp: 20-35. 1996.
151. **Rosenbaum A**, Paliodis D, Alley RM, Lisella J, Flaherty M. *Bacillus cereus* Fasciitis: A Unique Pathogen and Clinically Challenging Sequela of Inoculation. The American Journal of Orthopedics. A Case Report & Literature Review 2013; 37-39.
152. **Sagripanti JL**, Carrera M, Insalaco J, Ziemski M, Rogers J, Zandomeni R. Virulent spores of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species deposited on solid surfaces have similar sensitivity to chemical decontaminants. *J Appl Microbiol* 2006; 102: 11-21.
153. **Schlegelova J**, Brychta J, Klimova E, Napravnikova E, Babak V. The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. *Vet Med Czech* 2003; 48: 331-8.
154. **Senesi S**, Ghelardi E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins* 2010; 2: 1690-1703.
155. **Shaheen R**, Andersson MA, Apetroaie C, Schulz A, Ehling-Schulz M, Ollilainen VM, Salkinoja-Salonen MS. Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulid. *Inter J Food Microbiol* 2006; 107: 287- 294.
156. **Shinagawa K**. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Netherland Milk Dairy J* 1993; 47: 89-103.

-
157. **Shinagawa K**, Ueno Y, Hu D, Ueda S, Sugii S. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting type food poisoning. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 1027-1029.
158. **Shinagawa K**. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Inter J Food Microbiol* 1990; 10: 125-141.
159. **Sim RB**. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Hausler W. and M. Sussman (eds.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol.3. Arnold, London, Great Britain pp: 551-556. 1998.
160. **Smole Možina S**, Hočevar Grom A. Mikrobiološka varnost živil. V: Varnost živil. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci 18. in 19. marec. 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 29-43. 2004.
161. **Srinu B**, Vijaya Kumar A, Kumar E, Madhava Rao T. Antimicrobial resistance pattern of bacterial foodborne pathogens. *J Chem Pharm Res* 2012; 4(7): 3734-6.
162. **Sundin GW**. Distinct recent lineages of the strA-strB streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr Microbiol* 2002; 45: 63-69.
163. **Swiecicka I**, Van der Auwera G, Mahillon J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild animals. *Microbial Ecology* 2006; 52: 544-551.
164. **Szabo RA**, Speirs JI, Akhtar M. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *J Food Prot* 1991; 54: 272-276.

-
165. **Taylor AJ**, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. *J Med Microbiol* 1975; 8: 543-550.
166. **Taylor JMW**, Sutherland AD, Aidoo KE, Logan NA. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 242: 313-317.
167. **Teplova VV**, Mikkola R, Tonshin AA, Saris NEL, Salkinoja-Salonen MS. The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for Potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol Appl Pharm* 2006; 201: 39-46.
168. **Tewari A**, Singh SP, Singh R. Prevalence of Multidrug Resistant *Bacillus cereus* in Foods and Human Stool Samples in and Around Pantnagar, Uttrakhand. *J Advan Vet Research* 2012; 2: 252-5.
169. Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide - producing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5118-21.
170. **Ticknor LO**, Kolstø AB, Hill KK, Keim P, Laker MT, Tonks M, Jackson PJ. Florescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4863-4873.
171. **Todar's** online textbook of bacteriology. The Genus *Bacillus*. Wisconsin, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (26.7.2005). 2005.

-
172. **Tourasse NJ**, Helgason E, Økstad OA, Hegna I, Kolstø AB. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 579-593.
173. **Tourasse NJ**, Kolstø AB. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acid Res* 2008; 36: D461-468.
174. **Turnbull PCB**, Sirianni NM, LeBron CI, Samaan MN, Sutton FN, Reyer AE, Peruski LF. MICs of Selected Antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a Range of Clinical and Environmental Sources as Determined by E test. *J ClinMicrobiol* 2004; 42(5): 3626-34.
175. **Väisänen OM**, Mwaisumo NJ, Salkinoja- Salonen MS. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. *J App Bacteriol* 1991; 70: 315-324.
176. **Varnam AH**, Evans MG. Food poisoning: medical and microbiological overview; *Bacillus*. In foodborne pathogens, an illustrated text. Mosby year book, London, UK, pp: 9-19: 267-288. 1991.
177. **Vassileva M**, Torii K, Oshimoto M., Okamoto A, Agata N, Yamada K. et al. A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains *J Clinic Microbiol* 2007; 45: 1274-1277.
178. **Vyletětlová M**, Banykó J. Detection of codinggenes for enterotoxins in *Bacillus cereus* by PCR and their products by BCET-RPLA and ELISA Assay. *Acta univ agric et silvic Mendel Brun* 2010; LVIII: 417–426.

-
179. **Wang GYS**, Kuramoto M, Yamada K, Yazakawa K, Uemura D. Homocereulide, an extremely potent cytotoxic depsipeptide from the marine bacterium *Bacillus cereus*. *Chem Lett* 1995; 9: 791-792.
180. **Warren SC**, Gould GW. *Bacillus cereus* spore germination: absolute requirement for an amino acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1968; 170: 341-350.
181. **Weber DJ**, Saviteer SM, Rutala WA, Thomann CA. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 642-5.
182. **Whitehead RN**, Overton TW, Kemp CL, Webber MA. Exposure of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurum* to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PLoS One* 6: e228331- e228339. 2011.
183. **Whong CMZ**, Kwage JKP. Antibigrams of *Bacillus cereus* isolates from some Nigerian Foods. *Niger Food J* 2007; 25(1): 178-83.
184. **Wijnands LM**, Dufrenne JB, Rombouts FM, in't Veld PH, Leusden FM. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. *J Food Prot* 2006; 69: 2587-2597.
185. **Wijnands LM**, Dufrenne JB, van Leusden FM, Abee T. Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated Caco-2 cells, a human cell line mimicking the epithelial cells of the small intestine. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 5052-5054.
186. **Wong HC**, Chang MH, Fan JY. Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. *Appl Environ. Microbiol* 1988; 54(3): 699-702.

187. **Yokoyama K**, Ito M, Agata N, Isobe M, Shibayama K, Horii T, Ohta M. Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol Microbiol* 1999; 24: 115-120.
188. **You Y**, Hilpert M, Ward MJ. Identification of Tet 45, a tetracycline efflux pump, from a poultry-litter-exposed soil isolate and persistence of tet(45) in the soil. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1962-9.
189. **Yousten AA**. Germination of *Bacillus cereus* endospores: a proposed role for heat shock and nucleosides (review). *Canadian J Microbiol* 1975; 21: 1192-1197.
190. **Žlender B**. Predgovor. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z, Adamič J, Žlender B, Smole Možina S, Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: XI- XI. 2003.