

Izvirni znanstveni članek / Original article

## PRISOTNOST BAKTERIJE *BACILLUS CEREUS* V BOLNIŠKEM ODDELKU IN KUŽNINAH, TVORBA ENTEROTOKSINOV TER NJENA OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE

THE PRESENCE OF THE BACTERIUM *BACILLUS CEREUS* IN THE CLINICAL DEPARTMENT AND IN THE INFECTIOUS SAMPLES, ITS ENTEROTOXIN PRODUCTION AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS

Karmen Godič Torkar

**Ključne besede:** *Bacillus cereus*, občutljivost, antibiotiki, toksini

**Key words:** *Bacillus cereus*, susceptibility, antibiotics, toxins

### IZVLEČEK

**Izhodišča:** Največje tveganje za prenos okužb z mikroorganizmi je v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah. Pomembno vlogo pri preprečevanju bolnišničnih okužb imajo poleg higienskih služb predvsem komisije za obvladovanje bolnišničnih okužb, ki združujejo strokovnjake različnih specialnosti – zdravnike, medicinske sestre, epidemiologe, klinične mikrobiologe, farmacevte in sanitarne inženirje.

**Namen:** Ker je sporotvorna potencialno patogena bakterija *Bacillus cereus* možna povzročiteljica bolnišničnih okužb, je bil namen poskusa ugotoviti njeno prisotnost v kliničnem okolju. Pri dobljenih kliničnih izolatih in izolatih iz živil je bila testirana občutljivost za antibiotike in sposobnost tvorbe toksinov.

**Metode:** Za izolacijo in identifikacijo sevov *B. cereus* iz 38 brisov površin na opremi in inštrumentih v bolniških sobah, odvzetih v avgustu 2007, so se uporabljale standardne mikrobiološke preiskave. Za 60 bakterijskih sevov *B. cereus* je bila s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo z diski preskušena občutljivost za antibiotike in s testom Duopath® GLISA Cereus Enterotoxins sposobnost tvorbe diarealnih enterotoksinov.

**Rezultati:** *B. cereus* je bil prisoten v šestih (15,8 %) od 38 brisov, in sicer v brisih, odvzetih na površini podstavka za milo, embalaže z razkužilom, pladnja za hrano, posteljne podloge, uporabljenega tulca za odvzem krvi in koša za perilo. Vseh 60 sevov, osamljenih iz kužnin in živil, je bilo občutljivih za streptomycin in gentamicin, 90 % jih je bilo občutljivih za klindamicin in vankomicin, medtem ko jih je bilo 67 % občutljivih za eritromicin. Vsi izolati so bili odporni proti

### ABSTRACT

**Introduction:** The greatest risk for transfer of infections caused by microorganisms is in hospitals and other medical institutions. Accountable for the prevention of nosocomial infections are not only hygienic services but also special committees for hospital infection prevention and control. The latter is comprised of medical doctors, nurses, epidemiologists, clinical microbiologists, pharmacists and sanitary engineers.

**Aim:** *Bacillus cereus* is a sporeform, potentially pathogenic microorganism which may cause serious infections. The aim of the study was to determine the presence of its isolates in clinical environments. The antibiotic susceptibility and enterotoxin production of the tested strains was also examined.

**Methods:** Standard microbiological procedures were used in identification and isolation of *B. cereus* strains from 38 swabs taken from the surfaces of the equipment and instruments in sickrooms in one of the clinical departments in August 2007. The susceptibility of 60 *B. cereus* isolates from clinical specimens and foods to antibiotics was determined by Kirby-Bauer disc-diffusion method. For establishing the production of diarrhoeal enterotoxins, the Duopath® GLISA Cereus Enterotoxin test kit was used.

**Results:** In 6 (15.8 %) out of 38 collected swabs the presence of *B. cereus* was determined, namely from the surfaces of the soap saucer, package of the disinfectant, the meal serving, tray, bed lining, dirty linen basket and used syringe container. The second part of the experiment included the estimation of antimicrobial susceptibility of 60 clinical and food *B. cereus*

amoksicilinu s klavulansko kislino, ampicilinu, cefotaksimom, ciprofloksacinu, kloksacilinu, cefotaksimom s klavulansko kislino in penicilinu. Kar 98,3 % preskušanih sevov je tvorilo nehemolitični diarealni toksin, medtem ko jih je 31,7 % tvorilo hemolitični diarealni toksin. V primerjavi z izolati iz hrane je med kliničnimi izolati hemolitični diarealni toksin tvorilo deset odstotkov več izolatov. Nehemolitični diarealni enterotoksin je bil ugotovljen tudi pri psihrotrofnih sevih, inkubiranih pri temperaturi 6,5 °C.

**Razprava in zaključki:** *B. cereus* je bil najden na površinah in pripomočkih v prostorih kliničnega oddelka v kar 16 % primerov. Bakterijski sevi so bili odporni proti številnim testiranim antibiotikom in so vsi tvorili vsaj enega od diarealnih enterotoksinov. Rezultati tega poskusa so lahko uporabna informacija medicinskim sestram o kritičnih kontrolnih točkah odpornih potencialno patogenih mikroorganizmov. V poskusu sodelujoče medicinske sestre so izrazile potrebo po pogostejšem vzorčenju v bolniških oddelkih, saj bi lahko na osnovi rezultatov mikrobioloških preiskav primerno organizirale strategijo kontrole in obvladovanja bolnišničnih okužb.

## Uvod

Največje tveganje za prenos okužb z mikroorganizmi je v bolnišnici, deloma tudi v nekaterih drugih ustanovah (domovi za ostarele, zdravstveni domovi ipd.). Bolniki pridejo v bolnišnične ustanove zaradi zdravljenja nenalezljive ali nalezljive sporadične ali epidemične bolezni. V bolnišnicah se zadržijo krajši ali daljši čas, nekateri med njimi se kolonizirajo z bolnišničnimi bakterijami. V njih se zdravijo osebe, ki so bolne in neodporne in so kot take še pogostejše tarča bolnišničnih okužb ali kolonizacije z bolnišničnimi mikroorganizmi. Kolonizacija je lahko podlaga za širjenje patogenih in oportunističnih mikroorganizmov (Dragaš, Škerl, 2004; Gaspari, 2002).

Za uspešno nadzorovanje bolnišničnih okužb je potrebna dobro organizirana higienska služba in izobraženo osebje, zlasti zdravnik in medicinska sestra. Dnevno čiščenje predmetov in površin v neposredni bolnikovi okolici je naloga medicinske sestre s srednjo, višjo ali visokošolsko strokovno izobrazbo. Pravilno higiensko vzdrževanje je zlasti pomembno na oddelkih z večjim tveganjem za prenos okužbe, to so operacijske sobe, prostori za izvajanje dialize, enote za intenzivno zdravljenje in oddelki za bolnike z nalezljivimi boleznimi. Naloga medicinske sestre je tudi pravilno razkuževanje površin, onesnaženih z bolnikovimi izločki. Med bivanjem v bolnišnici lahko bolniki pridobijo bakterijske seve, odporne proti antibiotikom ali kemoterapevtikom, drugi take že prinesejo

isolates. All tested strains were susceptible to streptomycin and gentamycin, 90 % of them to clindamycin and vancomycin, and 67 % of strains to erythromycin. All isolates were resistant to amoxicillin with clavulanic acid, ampicillin, cefotaxime, ciprofloxacin, cloxacillin, cefotaxime with clavulanic acid and penicillin. Non-haemolytic diarrhoeal enterotoxin was produced by 98.3 % of the tested strains, while 31.7 % of them produced the haemolytic diarrhoeal enterotoxin. In comparison to food isolates ten percent more clinical isolates produced the haemolytic diarrhoeal enterotoxin.

**Discussion and conclusions:** *B. cereus* was found on equipment surfaces and instruments in almost 16 % of cases. Bacterial strains were resistant to various tested antibiotics, while all of them were capable to produce at least one of the diarrhoeal enterotoxins. The results of the study could serve as useful information source for nurses in defining the critical control points of resistant potential pathogenic microorganisms. The nurses who collaborated in the experiment expressed the need for more frequent sampling in clinical departments. The results obtained through microbiological examinations of these samples would dictate the necessary future actions, surveillances as well as protection procedures.

s seboj v bolnišnico. Posebno pozornost je potrebno poleg okužb dihal, črevesnih okužb, spolno prenosljivih bolezni, tuberkulozi ipd. posvetiti prav proti antibiotikom odpornim bakterijam (Dragaš, Škerl, 2004; Gaspari, 2002).

Antibiotiki so učinkovine, ki jih tvorijo različni mikroorganizmi ali jih umetno sintetiziramo. Zavirajo rast ali uničijo bakterije. Vendar so antibiotiki lahko tudi škodljivi, in sicer ne samo za bolnika, temveč tudi za okolico. Ne delujejo samo na mikroorganizme, ki so povzročitelji bolezni, ampak tudi na normalno mikrofloro, ki se nahaja kot zaščita na koži ali sluznicah. Tako se na telesnih površinah razrastejo bakterije ali glive, ki niso občutljive za dani antibiotik oziroma antimikotik. Le-te lahko povzročijo lokalne okužbe, prodrejo v tkivo, se razširijo po organizmu, lahko se celo prenesejo na druge osebe. Odporni mikroorganizmi lahko svojo odpornost prenesejo tudi na druge mikroorganizme (Čižman, 2002). Tako danes v bolnišnicah predstavljajo resen problem okužbe z bakterijskimi sevi, ki so odporni proti več različnim antibiotikom, npr. *Staphylococcus aureus*, odporen proti metilicilinu (MRSA – angl. meticillin-resistant *S. aureus*), enterokoki, odporni proti vankomicinu (VRE – angl. vancomycin-resistant enterococci), ali nekatere enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (Seme, Poljak, 2003).

Vir okužbe so lahko tudi raztopine, ki se uporabljajo v zdravstvu, npr. destilirana voda, fiziološka raz-

topina, infuzijske raztopine in tudi raztopine antiseptikov za razkuževanje kože in sluznic, očne kapljice ipd. Te raztopine so bile sicer predhodno sterilizirane, vendar so se zaradi večkratnega odvzema iz iste steklenice ali nepravilnega hranjenja v teh raztopinah namnožili mikroorganizmi. Tudi v milih in razkužilih, zlasti tistih, ki so na alkoholni osnovi, ali tistih, kjer ima delovna raztopina razkužila nižjo koncentracijo od priporočene, so zasledili po Gramu negativne bakterije in sporotvorne bakterije rodu *Bacillus*. Ti mikroorganizmi imajo ali pridobijo poleg odpornosti proti antibiotikom tudi odpornost proti razkužilom. Bakterije so bolj odporne takrat, ko so ovite v biofilm ali polisaharidni glikokaliks, saj takrat razkužila in antibiotiki težje prehajajo do celic, bakterije pa razvijejo nove oblike genetsko pogojene odpornosti. Biofilmi lahko nastanejo na hrapavih površinah pultov, postelj, pladnjev, aparatur, instrumentov ipd. (Dragaš, Škerl, 2004).

*B. cereus* je v okolju pogost saprofitni mikroorganizem, od koder se prenaša preko predelovalne verige tudi v živila. Je zelo odporen in prilagodljiv. V obliki spor preživi pasterizacijo, neobčutljiv je za številna razkužila, npr. alkohole. Zastrupitve s hrano, ki jih povzroča *B. cereus*, so znane že več kot 25 let. Pojavljata se dve obliki zastrupitve: diarealni in emetični sindrom. Prvi nastane največkrat 10 do 12 ur po uživanju mesne hrane, zelenjavnih jedi, sladice, omak in juh zaradi enterotoksina v hrani. Spremljajo ga lahko tudi dolgotrajne sluzno krvave driske. Hemolitični diarealni toksin (HBL) ali nehemolitični diarealni toksin (NHE) tvori bakterija med razmnoževanjem v tankem črevesu (Granum, Lund, 1997). Emetični toksin povzroča bruhanje eno do šest ur po zaužitju hrane, največkrat riža in testenin, če stoji hrana na sobni temperaturi in so ji dodana tudi jajca (Dragaš, Škerl, 2004). V tem primeru gre za zastrupitev, saj se toksin tvori že v živilu (Agata et al., 1995; Giffel, 1999).

*B. cereus* je del normalne človeške mikroflore, posebnost pri bolnikih, ki so dolgo hospitalizirani (Ginsburg et al., 2003; Drobniowski, 1993). Tako ta mikroorganizem lahko povzroča tudi hude infekcije. Okužbe ran so lahko blage ali težke z nekrozami. Posebno pri dojenčkih lahko *B. cereus* povzroča težke okvare oči, npr. keratitis, endoftalmitis ali panoftalmitis, tudi sepse, bakteriemije, infekcije kirurških ran, mieloplazije ipd. (Ozkocaman et al., 2006; Cone et al., 2005; Ginsburg et al., 2003; Mori et al., 2002; Strauss et al., 2001; Dragaš et al., 1997). Pri nas so zasledili bolnišnično okužbo z bakterijo *B. cereus* pri skupini otrok, kjer so dokazali bakteriemijo in sepso. Po preiskavah so ugotovili, da je vzrok okužbe večkrat pregreta otroška hrana, ki so jo bolniki prejeli z gastrojeunalno cevko (Dragaš, Škerl, 2004).

Šele ko so ugotovili pomen bakterije *B. cereus* pri težjih infekcijah, so začeli preučevati tudi njeno občutljivost za antibiotike. Ugotovili so, da je odporna

proti penicilinu in betalaktamskim antibiotikom, ker tvori encime betalaktamaze (Chen et al., 2003). Prav tako je danes znano, da klavulanska kislina nekaterih njenih betalaktamaz ne inhibira (Baldwin et al., 1980; Connolly, Waley, 1983; Nielsen, Lampen, 1983; Hus-sain et al., 1985; Felici et al., 1993; Chen et al., 2003).

## Namen

Namen poskusa je bil:

- ugotoviti prisotnost bakterije *B. cereus* v brisih površin opreme in inštrumentov v bolniških sobah kliničnega oddelka;
- določiti občutljivost za antibiotike pri sevih *B. cereus*, izoliranih iz kliničnih vzorcev in vzorcev živil, ki so bila poslana na mikrobiološko preiskavo zaradi suma, da so po zaužitju povzročila infekcijo z bakterijo;
- pri izoliranih sevih *B. cereus* preveriti sposobnost tvorbe enterotoksinov;
- preskusiti rast bakterijskih sevov in ugotoviti tvorbo toksinov pri temperaturi hlajenja 6,5 °C.

## Metode

### Vzorčenje in bakterijski sevi

V prvem delu poskusa smo v avgustu 2007 odvzeli 38 brisov površin na opremi in inštrumentih v bolniških sobah, sobi za medicinske sestre, na hodniku in v sobi za rekreacijo v enem izmed kliničnih oddelkov v Ljubljani. Iz brisov smo izolirali prisotne seve *B. cereus*. Mesta odvzema brisov so navedena v Razpredelnici 1.

V drugem delu poskusa smo, poleg izolatov iz brisov, uporabili tudi izolate *B. cereus* iz kužnin (rane, opekline, blato, drugi izločki, sluhovodi, nosne votline ipd.) ter iz živil, ki so bila poslana na mikrobiološke preiskave zaradi suma, da vsebujejo to bakterijo v infektivnih koncentracijah (mleko, sladoled, mleko v prahu, solate, riževe jedi, pudingi, otroška hrana, omake, cmoki, suhe začimbe, mesne jedi ipd.). Skupno smo testirali 60 sevov.

V poskusu smo uporabili tudi kontrolne standardne seve *B. cereus* ATCC 11778 (Oxoid), *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *S. aureus* ATCC 29213 in *Escherichia coli* ATCC 25922.

### Izolacija in biokemijska identifikacija bakterij *B. cereus*

Iz odvzetih brisov smo prenesli vzorce v tekoče hranljivo gojišče s triptonom, sojinim ekstraktom in polimiksinom ter jih inkubirali pri 30 °C 24 ur. V brisih smo želeli ugotoviti tudi prisotnost spor bakterije *B. cereus*, zato smo vzorce brisov segrevali v vodni

kopeli pri temperaturi 80 °C 10 minut, da so spore germinirale. Namnoženo kulturo smo nato prenesli na trdna gojišča MYP in PEMBA (Merck). Značilne modro obarvane kolonije zaradi nezmožnosti razgradnje manitola in s cono zaradi razgradnje lecitina smo precepili na gojišče za defibrinirano ovčjo krvjo in ugotavljali hemolitično aktivnost izolatov (ISO 7932, 2004). Izolate smo identificirali s pomočjo biokemijskih testov API 50 CHB in API 10 S (Biomerieux), pri čemer smo uporabili računalniški program za identifikacijo V.1.1.0 (isti proizvajalec).

Ostale bakterijske seve iz kužnin in živil smo dobili z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter Inštituta za varovanje zdravja RS. Tudi te izolate smo najprej prenesli na že prej omenjena mikrobiološka gojišča in jih testirali z biokemijskimi testi API.

### Ugotavljanje občutljivosti za antibiotike

Občutljivost 60 izolatov *B. cereus* smo ugotavljali z difuzijsko metodo z diski (National, 2001). Bakterijsko suspenzijo smo razmazali po površini trdnega gojišča in nato nanесли diske, prepojene z antibiotiki. Nacepljena gojišča smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 24 ur in izmerili premere inhibicijskih con okrog diskov z antibiotiki. V poskusu smo uporabili naslednje diske z antibiotiki (BD BBL®, Becton Dickinson): amoksisicilin s klavulansko kislino AMC – 30 mg, ampicilin AM 10 mg, cefotaksim CTX – 30 mg, cefotaksim s klavulansko kislino CTX/CLA 30/10 mg, ciprofloksacin CIP – 5 mg, klindamicin CC – 2 mg, kloksacilin CX – 1 mg, eritromicin E – 2 mg, gentamicin GM – 10 mg, penicilin P – 10 IE, streptomycin S – 10 mg in vankomicin Va – 30 mg.

### Ugotavljanje tvorbe diarealnih enterotoksinov

Za ugotavljanje hemolitičnega (HBL) in nehemolitičnega (NHE) diarealnega toksina pri preskušeni sevov *B. cereus* smo uporabili test Duopath® GLISA *Cereus* Enterotoxins (Merck). Test smo izvajali po navodilih proizvajalca. Bakterijske seve smo namnožili v tekočem gojišču CGY z dodatkom 1% glukoze in jih inkubirali pri 37 °C 4 ure. 180 ml kulture smo prenesli na testno ploščico. Po 25 minutah smo odčitali rezultat. Pojav prve črtice je pomenil, da sev tvori HBL, pojav druge črtice pa, da sev tvori NHE.

### Rast bakterijskih sevov pri temperaturi 6,5 °C

Vse bakterijske izolate smo razmazali po površini trdnega gojišča BHI (Merck) in jih inkubirali pri temperaturi 6,5 °C sedem do deset dni. Pri tistih sevih, ki

so na gojišču tvorili kolonije, smo preskusili tudi sposobnost tvorbe diarealnih enterotoksinov pri tej temperaturi. Postopek testiranja je bil enak kot prej, le da smo bakterijsko kulturo inkubirali pri 6,5 °C 24 do 48 ur in prenesli na testno ploščico Duopath® *B. cereus*.

### Statistične analize

Za statistično analizo smo uporabili računalniški program SAS/STAT (2000). Računali smo osnovno statistiko vključno s povprečji, standardnimi odkloni, koeficientom variacije, največjimi in najmanjšimi vrednostmi. Za računanje razlik med izolati v občutljivosti na antibiotike smo uporabili t-test.

## Rezultati

### Identifikacija izolatov

Če so izolati iz brisov in kužnin tvorili modrikaste razširjajoče se kolonije s precipitacijsko cono na gojišču PEMBA oziroma rdečkaste razširjajoče se kolonije s precipitacijsko cono na gojišču MYP, smo lahko predpostavljali, da pripadajo vrsti *B. cereus*. Takšna značilna morfologija kolonij namreč kaže na to, da so sevi tvorili encim lecitinazo in da niso bili sposobni razgrajevati manitola. Na krvnem agarju so sevi *B. cereus* tvorili zelenkaste kolonije z značilno hemolizo beta. Bakterijske celice sveže kulture so bile po Gramu pozitivne, paličaste oblike, lahko z značilnimi endosporami. Kot vrsto *B. cereus / thuringiensis* smo te izolate potrdili še z biokemijskimi testi API in s testom na gibljivost.

Prisotnost bakterij vrste *B. cereus* v brisih

Bakterijo *B. cereus* smo zasledili v šestih (15,8 %) od 38 odvzetih brisov površin opreme in instrumentov v bolniških sobah kliničnega oddelka. V treh (7,9 %) vzorcih smo našli vegetativne bakterijske oblike, prav tako v treh (7,9 %) vzorcih spore. Rezultati so navedeni v Razpredelnici 1.

### Občutljivost za antibiotike

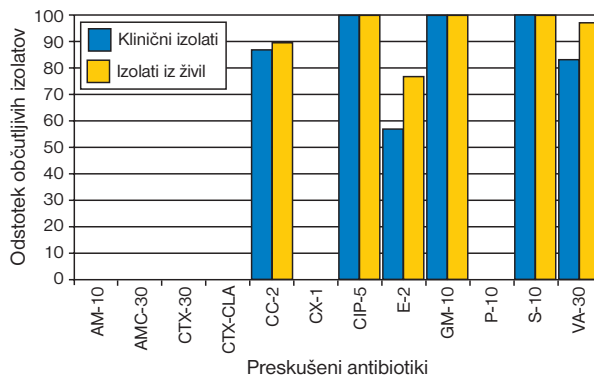
Pri difuzijski metodi z diski mednarodnih standardov mejnih vrednosti za občutljivost in neobčutljivost vrste *B. cereus* ni. Zato smo uporabili mejne vrednosti premerov inhibicijskih con okrog diskov za stafilokoke oziroma za bakterijo *S. aureus*. Po teh standardih je bilo vseh 60 preskušeni sevov občutljivih za ciprofloksacin, streptomycin in gentamicin. Kar 53 (88,3 %) izolatov je bilo občutljivih tudi za klindamicin, ostalih sedem (11,7 %) je bilo delno občutljivih (intermediarnih). Za vankomicin je bilo občutljivih šest (10 %) izolatov in za eritromicin 40 (66,7%) izolatov. Vsi izolati so bili neobčutljivi za amoksisicilin s klavulansko kislino, ampicilin, kloksacilin, cefotaksim in cefotaksim s klavulansko kislino ter penicilin. Izo-

Razpr. 1. Prisotnost vegetativnih oblik in spor bakterije *B. cereus* v brisih, odvzetih na površinah bolniških sob in prostorov kliničnega oddelka

Table 1. The presence of the *B. cereus* vegetative forms and spores in swabs, sampled from the areas of the sickrooms and other places in clinical department

Zap. št. brisa	Mesto odvzema brisa	Prisotnost vegetativnih oblik <i>B. cereus</i>	Prisotnost spor <i>B. cereus</i>
1	Umivalnik v bolniški sobi		
2	Podstavek za milo		+
3	Površina notranjosti sistema za dihanje		
4	Obleka zdravstvenega delavca		
5	Zaščitna ograja na bolniški postelji		
6	Bolnikova miza		
7	Vznožje bolniške postelje		
8	Škatla za rokavice		
9	Črpalka za hrano		
10	Telefon		
11	Posteljna podloga	+	
12	Papirnate brisače		
13	Koš za perilo v bolniški sobi		+
14	Tipalo aparata za ultrazvok		
15	Nosni filter		
16	Umazana bolnikova rjuha		
17	Računalniška tipkovnica v sobi za medicinske sestre		
18	Infuzijska črpalka		
19	Kljuka na vratih bolniške sobe		
20	Koš za smeti v bolniški sobi		
21	Umivalnik na hodniku pred bolniško sobo		
22	Uporabljen tulec za odvzem krvi	+	
23	Sondna hrana		
24	Obveza centralnega venskega katetra		
25	Stetoskop		
26	Embalaža z razkužilom		+
27	Voziček za posege		
28	Telefon v sobi za med. sestre		
29	Vodovodna pipa v bolniški sobi		
30	Pladenj za hrano	+	
31	Očiščena nočna posoda		
32	Dlan zdravstvenega delavca 1		
33	Dlan zdravstvenega delavca 2		
34	Bolnikova pižama		
35	Umivalnik v sobi za rekreacijo		
36	Voziček za prevoz obrokov hrane		
37	Odrpna dietna hrana		
38	Vrečka s transfuzijsko tekočino		
	Skupno število brisov z bakterijo <i>B. cereus</i>	3	3
	Total number of swabs contaminated with <i>B. cereus</i>		

lati so se med seboj razlikovali v občutljivosti za klindamicin, vankomicin in eritromicin. 38 (63,3 %) sevov je bilo občutljivih za kombinacijo teh treh antibiotikov. Ugotovili smo še šest drugih vzorcev občutljivih izolatov



Legenda: oznake antibiotikov: ampicilin AM 10 mg, amoksisilin s klavulansko kislino AMC - 30 mg, cefotaksim CTX - 30 mg, cefotaksim s klavulansko kislino CTX/CLA 30/10 mg, klindamicin CC - 2 mg, kloksacilin CX - 1 mg, ciprofloksacin CIP - 5 mg, eritromicin E - 2 mg, gentamicin GM - 10 mg, penicilin P - 10 IE, streptomycin S - 10 mg, vankomicin Va - 30 mg  
 Legend: abbreviations of the antibiotics: ampicillin AM 10 mg, amoxicillin with clavulanic acid AMC - 30 mg, cefotaxime CTX - 30 mg, cefotaxime with clavulanic acid CTX/CLA 30/10 mg, clindamycin CC - 2 mg, cloxacillin CX - 1 mg, ciprofloxacin CIP - 5 mg, erythromycin E2 mg, gentamicin GM - 10 mg, penicillin P - 10 IE, streptomycin S - 10 mg, vancomycin Va - 30 mg

Sl. 1. Odstotek občutljivih kliničnih izolatov in izolatov iz živil za preskušene antibiotike z uporabo difuzijske metode z diski.

Fig. 1. Percent of susceptible clinical and food isolates on tested antibiotics using disc diffusion method.

Razpr. 2. Število (%) izolatov vrste *B. cereus* z različnimi vzorci občutljivosti za uporabljene antibiotike

Table 2. The number (%) of *B. cereus* isolates with different susceptibility patterns to antibiotics

Vzorec št.	Vzorec <sup>a</sup> CC E Va	Število (%) kliničnih izolatov	Število (%) izolatov iz živil	Skupaj število (%)	Vzorec, značilen pri skupini izolatov
1	S S S <sup>b</sup>	17 (56,7)	21 (70)	38 (63,3)	obe
2	S I S	3 (10,0)	1 (3,3)	4 (6,7)	obe
3	I R R	4 (13,3)	0 (0)	4 (6,7)	klinični
4	S R S	5 (16,7)	4 (13,4)	9 (15,0)	obe
5	S R R	1 (3,3)	1 (3,3)	2 (3,3)	obe
6	I S S	0 (0)	2 (6,7)	2 (3,3)	živila
7	I I S	0 (0)	1 (3,3)	1 (1,7)	živila

<sup>a</sup> Vzorec: občutljivost izolatov za kombinacijo različnih antibiotikov, ki smo jih uporabili v poskusu: razlike med izolati se kažejo v občutljivosti na klindamicin (CC), eritromicin (E) in vankomicin (Va)

<sup>a</sup> Pattern: the sensitivity of the isolates to the combination of different antibiotics used in the experiment: the differences among isolates are expressed in the susceptibility to clindamycin (CC), erythromycin (E) and vancomycin (Va)

tljivosti za kombinacije različnih antibiotikov. En vzorec občutljivosti za kombinacijo različnih antibiotikov je bil značilen samo za izolate iz kliničnih vzorcev, dva vzorca pa le za izolate iz vzorcev živil (Razpr. 2). Opazili nismo nobenih statistično značilnih razlik ( $p > 0,05$ ) v premerih inhibicijskih con med izolati, dobljenimi iz kliničnih vzorcev in vzorcev živil, razen pri preskušanju s cefotaksimom ( $p = 0,05$ ) in cefotaksimom s klavulansko kislino ( $p = 0,04$ ).

### *Tvorba hemolitičnega in nehemolitičnega diarealnega enterotoksina*

Vseh 60 izolatov vrste *B. cereus* smo testirali z imunoabsorpcijskim testom Duopath® GLISA Cereus Enterotoxins. Kar 59 (98,3 %) izolatov je tvorilo NHE, medtem ko jih je 19 (31,7 %) tvorilo tudi HBL. Toksin NHE smo ugotovili pri vseh kliničnih izolatih in pri 96,7 % izolatov iz živil. Toksin HBL je tvorilo 36,7 % kliničnih izolatov in 26,7 % izolatov iz živil. Kar 73 % izolatov, ki so se razmnoževali v kulturi pri temperaturi inkubacije 6,5 °C, je pri tej temperaturi tudi tvorilo toksin NHE, nobeden od izolatov pa ni tvoril toksina HBL.

### **Razprava**

Prisotnost bakterije *B. cereus* smo ugotovili v 15,8 % od 38 odvzetih brisov površin opreme in inštrumentov v bolniških sobah kliničnega oddelka. V polovici vzorcev smo našli aktivne bakterijske oblike, v drugi polovici vzorcev pa *B. cereus* v obliki spor. Menimo, da je to število dokaj visoko, še posebno, ker so vsi izolirani sevi tvorili NHE. Predvidevamo, da je izolat, ki smo ga našli na površini pladnja za serviranje hrane, prišel iz živila, ki so ga dostavili bolniku na pladnju. Jed se je verjetno med obrokom prenesla na pladenj, ugodni temperaturni pogoji in ostanki hrane pa so omogočili uspešno in hitro namnožitve bakterij. Zato je priporočljivo, da hrana ne stoji dolgo pri sobni temperaturi, ker predstavlja ugodno okolje za namnožitve bakterij in tvorbo njihovih toksinov (Borge et al., 2001; Klun, 2002).

Tudi Klun (2002) navaja podatke Svetovne zdravstvene organizacije, da se *B. cereus* pogosto prenaša z živili in vodo ter tvori tudi toksine. V obdobju 1991 do 1996 so zabeležili tri epidemije, od leta 1996 do 1999 je bilo prijavljenih 265 okužb in od 2000 do 2007 so prijavili 122 obolelih ter dve epidemiji (Klun, 2002; Kreigher et al., 2000; Kreigher et al., 2002; Kreigher et al., 2006; Kreigher et al., 2008). Posebno nevarne so okužbe v bolnišnicah, kjer navadno prizadenejo ogrožene skupine bolnikov z zmanjšano imunsko odpornostjo, otroke in ostarele. Najpogostejši vzroki za nastanek okužb z živili in vodo so naslednji: neustrezna temperatura ohlajevanja, kuhanja, pogrevanja in hranjenja pripravljene hrane, neustrezne surove su-

rovine, neustrezno ravnanje z živili (navzkrižna okužba, oporečna higiena, uporaba ostankov živil), okužba zaradi zaposlenih, neustrezne opreme ali prostora (Klun, 2002). Okužba z živili je najpogostejša pri termično obdelanih izdelkih, kjer spore preživijo, ponovno segrevanje pa povzroči njihovo germinacijo in tvorbo toksinov (Borge et al., 2001).

Že dolga leta so uzakonjeni tudi predpisi o sanitarno-mikrobiološkem nadzoru hrane ter obratov za pripravo hrane, saj morajo bolnišnične kuhinje upoštevati pravila dobre proizvodne prakse. Nekaj več možnosti za okužbo predstavlja že tovarniško pripravljena hrana (npr. otroška hrana), ki je pred uporabo ni treba kuhati. Vzrok za okužbo je lahko že okužen tovarniški pripravek, okužena voda, posoda, neprimeren in predolg prevoz, nepravilno hranjenje živila ter seveda okužba z umazanimi rokami. Posebno pozorno je treba nadzirati enteralno hrano, ki jo bolniki dobivajo z nazogastrično ali jejunarno sondo (Dragaš, 2002).

Vzrok za pojav in prenos mikroorganizmov in parazitov je tudi pomanjkljiva higiena rok. Poleg drugih mikroorganizmov je tudi *B. cereus* možen povzročitelj bolnišničnih črevesnih okužb, ki se lahko prenašajo z rokami oz. so posledica slabe higiene. V manjših količinah je sicer del prehodne oz. prehodnostalne populacije na rokah bolnikov in osebja (Dragaš, Škerl, 2004). Tako je potrebno predhodno umivanje in razkuževanje, po možnosti s sporocidnimi razkužili. Osebe in bolnik lahko s tem mikroorganizmom okužijo tudi predmete in površine v okolici bolnika (igračice, kljube, telefone, termometre, nočne posode, posteljnino, temperaturne liste ipd.).

Dragaš et al. (1997) poudarjajo, da okužbe z bakterijo *B. cereus* največkrat nastanejo v bolnišnicah, kjer jo lahko najdemo na perilu, na prevezah, katetrih, mazilih, v milih, razkužilih, v alkoholu za razkuževanje, na rokah osebja, v hrani za enteralno in parenteralno uporabo ipd.

Tudi v našem poskusu smo bakterijo zasledili na posteljni podlogi in košu za umazano perilo. Na površino koša se je po vsej verjetnosti prenesla iz umazanega perila, le-to pa se je kontaminiralo bodisi s hrano, bolnikovimi izločki ali s površino kože, saj je *B. cereus* lahko del normalne človeške flore, lahko pa je tudi povzročitelj nekrotičnih ran (Brown, Garn-Hansen, 2002; Buwa, van Staden, 2006).

Na perilu se nahaja veliko bakterij, poleg vrste *Bacillus* največkrat tudi po Gramu negativne bakterije in koagulaza negativni stafilokoki, zato moramo s perilom ravnati previdno, da ne postane vir okužbe. Posebno pozorno moramo zbirati in razvrščati umazano perilo na mestu uporabe, npr. ob bolniških posteljah. Tako ne smemo vzdigovati prahu in s tem klic iz perila po prostoru, okuženo perilo je namreč lahko kontaminirano z izločki in krvjo bolnika (Vertelj, 2002).

*B. cereus* tvori spore in je zato pogosto odporen proti učinkovanju razkužil, proti segrevanju ipd. Zato moramo biti na ta mikroorganizem še posebej pozorni, zlasti pri njegovem odstranjevanju oziroma uničevanju. *B. cereus* so našli tudi na rokah bolniškega osebja in površinah inkubatorjev za nedonošenčke (Dragaš, Škerl, 2004).

Do kontaminacije mil in razkužil z manj zahtevnimi bakterijami iz okolja lahko pride že pri proizvodnji, najpogosteje pa pri nepravilni pripravi ali redčenju z že kontaminirano vodo. Bakterije rodu *Bacillus* so našli tudi v 70% etanolu. Kontaminacije razkužil so pogoste v posodah za razkužilo, če se le-te ne menjajo, če v njih razkužilo oziroma milo dolgo stoji ali se milo in razkužilo v posodo le dotaka. Ker alkoholi niso sporocidni, morajo biti pred uporabo v zdravstveni ustanovi aseptično filtrirani. Zaradi alkohola, kontaminiranega s sporami, lahko pri invazivnih posegih nastanejo sporogene okužbe. Če je razkužilo potrebno redčiti, naj to nadzorovano opravi lekarna v količini in embalaži, primerni za čim hitrejšo porabo. Odpornost bakterij proti razkužilom je večja, če le-te na hrapavi površini tvorijo biofilm ali polisaharidni glikokaliks (Dragaš, Škerl, 2004). Do celic, ki so v biofilmu zaščitene z glikokaliksom, razkužilo veliko težje prihaja in tako tudi nanje slabše učinkuje, bakterijske celice v biofilmu razvijejo tudi genetsko pogojeno odpornost proti razkužilom in tudi antibiotikom. Peng, Tsai, Cheng (2002) so ugotovili, da se je število prostih vegetativnih celic *B. cereus* zmanjšalo za več kot 5,0 log KE/ml v 15 sekundah pri delovanju hipoklorita v koncentraciji 25 ppm ali 100 ppm kvartatnih amonijevih substanc. Oba navedena pripravka razkužil po 5 minutah delovanja nista znižala števila bakterij v biofilmu. Še bolj odporne so celice v biofilmih, če se biofilm razvija na organski podlagi, npr. na ostankih maščob, beljakovin in sladkorjev.

Na spore učinkujejo predvsem razkužila, ki temeljijo na klorovih pripravkih, glutaraldehydih in peroksidih. Coates (1996) je ugotovil, da je razkužilo, ki je vsebovalo 3180 ppm klora, zmanjšalo število spor *Bacillus* za faktor  $10^5$  šele po eni uri, razkužilo s koncentracijo klora 5780 ppm pa v petih minutah. Enak učinek je imel 1% vodikov peroksid po dveh do treh urah, pripravek peroksiocetne kisline je učinkoval takoj, pripravek glutaraldehyda pa v dveh urah. Delovanje vseh pripravkov je bilo daljše, če so bile spore v raztopini z dodano 2% krvjo. Beljakovine in druge organske snovi namreč zmanjšajo učinek in podaljšajo čas, potreben za delovanje razkužil.

Posebno pozornost je potrebno posvetiti tudi aseptični tehniki in sterilnosti inštrumentov pri odvzemu kužnin, npr. krvi. V našem primeru smo ugotovili bakterijo tudi na uporabljenem tulcu za odvzem krvi. Grossek et al. (2002) navajajo, da so okužbe s predstavnički rodu *Bacillus* zasledili tudi v otroškem oddelku za

intenzivno zdravljenje v 1,25 % primerov, predvsem je šlo za sepe oziroma katetrške sepe.

Raziskave zadnjih let so pokazale, da je *B. cereus* odporen proti številnim antibiotikom (Roy, Moktan, Sarkar, 2007; Meena, Kapoor, Agarwal, 2000; Teuber, 1999). Mnogi zato želijo ugotoviti vzorec odpornosti za različne antibiotike pri tej bakteriji (Roy, Moktan, Sarkar, 2007).

V našem poskusu smo ugotavljali občutljivost za antibiotike pri izolatih iz brisov površin, kužnin in vzorcev hrane. Vsi bakterijski izolati so bili občutljivi le za streptomycin, ciprofloksacin in gentamicin. Večina sevov (90 %) je bila občutljivih tudi za klindamicin in vankomicin ter 67 % sevov tudi za eritromicin. Naši rezultati se ujemajo s podatki Drobniwskega (1993) in Jorgensena (2004). Po drugi strani pa Meena, Kapoor, Agarwal (2000) poročajo o izolatih *B. cereus* iz živil, ki so odporni tudi proti streptomycinu in gentamicinu. Naš vzorec občutljivosti kliničnih izolatov na preskušene antibiotike je podoben vzorcema, ki so jih dobili Dubois et al. (2005) in Al-Khatib et al. (2007), vendar s to razliko, da smo mi ugotovili več odpornih sevov proti eritromycinu.

Znano je, da *B. cereus* tvori encime cinkove beta-laktamaze, ki inaktivirajo betalaktamske antibiotike, npr. peniciline in cefalosporine, tudi če je dodana klavulanska kislina (Baldwin et al., 1980; Connolly, Walley, 1983; Chen et al., 2003). Tako ni presenetljivo, da so bili vsi naši izolati neobčutljivi za testirane betalaktamske antibiotike.

Teuber (1999) meni, da so mehanizmi prenosa genov za odpornost proti antibiotikom enaki pri bakterijah iz okolja, živil in kliničnih materialov, čeprav smo v našem poskusu ugotovili statistično značilne razlike v občutljivosti za antibiotike med kliničnimi izolati in izolati iz živil tako za cefotaksim kot tudi za cefotaksim s klavulansko kislino. Prav tako se kažejo razlike v vzorcih občutljivosti za antibiotike. Za uporabljene antibiotike smo ugotovili sedem različnih vzorcev občutljivosti. Za skoraj 62 % izolatov je bil značilen prvi vzorec. Ti izolati so bili občutljivi za klindamicin, eritromicin in vankomicin, medtem ko so bili za ostale antibiotike neobčutljivi. En vzorec občutljivosti je bil značilen le za klinične izolate, dva vzorca občutljivosti pa le za izolate iz živil (Razpr. 2).

### Tvorba diarealnih enterotoksinov

NHE je v našem poskusu tvorilo kar 97 % izolatov iz živil in 100 % kliničnih izolatov. HBL smo zasledili le pri 27 % izolatov iz živil in 37 % kliničnih izolatov. Med obema skupinama se torej kažejo razlike v številu izolatov, ki so tvorili toksin HBL. Čeprav Svensson et al. (2007) poročajo, da psihotropni sevi *B. cereus* iz mleka ne tvorijo večjih količin diarealnih enterotoksinov, naši podatki kažejo, da 73 % psihotropnih izolatov iz živil tvori toksin NHE tudi pri

temperaturi 6,5 °C, vendar ne tudi toksina HBL. Veld et al. (2001) so zasledili 55 % psihrotrofnih izolatov *B. cereus* iz pasteriziranega mleka, ki so tvorili tudi toksin HBL; odstotek sevov, ki so tvorili toksin NHE, pa je podoben rezultatu v našem poskusu.

## Zaključek

*B. cereus* smo na površinah in pripomočkih v prostorih kliničnega oddelka zasledili v kar 16 % primerov. Prisotnost te vrste bakterij je problematična, ker te bakterije tvorijo spore in so zato zelo odporne proti segrevanju pri visokih temperaturah in proti delovanju razkužil. Tako mora biti medicinsko osebje v bolniških oddelkih pozorno na pravilno ravnanje s pripravljeno hrano, perilom, uporabljenimi instrumenti, na higieno rok ter predvsem na izbiro in pravičen postopek priprave ustreznih čistil ter razkužil. Tu imajo ustrezno usposobljene medicinske sestre, ki so seznanjene s tem problemom, pomembno vlogo.

*B. cereus* lahko povzroči gastrointestinalne težave ali infekcije ran, opeklin, oči ipd., zato moramo ob nje-govi prisotnosti nujno ukrepati, večkrat tudi z zdravljenjem z antibiotiki iz skupin kinolonov, aminoglikozidov in glikopeptidov.

*B. cereus* je komenzalen, zoonotičen in potencialno patogen mikroorganizem s širokim spektrom odpornosti proti antibiotikom ter s sposobnostjo tvorbe različnih toksinov. Geni, ki so odgovorni za odpornost, se lahko prenesejo na druge, tudi patogene mikroorganizme. Bakterija naseljuje različne ekološke niše, npr. prst, vodo, vegetacijo, zrak, od koder z lah-koto prehaja na živali, v živila, predelovalno verigo živil, v klinično okolje ipd. Številni avtorji so si edini, da je prisotnost tako velikega števila za antibiotike neobčutljivih sevov *B. cereus* v vzorcih živil in kliničnih humanih vzorcih zelo zaskrbljujoča.

Problem pojavljanja za antibiotike neobčutljivih patogenih mikroorganizmov v humani medicini bo-mo rešili le v tesnem sodelovanju med farmacevti, zdravniki, medicinskimi sestrami in drugim zdravstvenim osebjem, veterinarji, mikrobiologi, ekologi ter živilskimi tehnologi.

## Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo proizvajalcu MERCK KGaA, Darmstadt, iz Nemčije ter predstavništvu MERCK Slovenija za testne komplete Duopath® *B. cereus* in sodelujočim medicinskim sestram iz Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

## Literatura

- Agata N, Ohta A, Arakawa Y, Mori M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. *Microbiology* 1995;141(4):983–8.
- Al-Khatib MS, Khyami-Horani H, Badran E, Shehabi AA. Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(4):383–7.
- Baldwin GS, Edwards GF, Kiener PA, Tully MJ, Waley SG, Abraham EP. Production of a variant of  $\beta$ -lactamase II with selectively decreased cephalosporinase activity by a mutant of *Bacillus cereus* 569/H/9. *Biochem J.* 1980;191(1):111–6.
- Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int J Food Microbiol.* 2001;69(3):237–46.
- Brown B, Garn-Hansen B. Mecillinam susceptibility as an indicator of  $\beta$ -lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(2):122–4.
- Buwa LV, van Staden J. Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South Africa. *J Ethnopharm.* 2006;103(1):139–42.
- Chen Y, Succi J, Tenover FC, Koehler TM.  $\beta$ -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol.* 2003;185(3):823–30.
- Coates D. Sporicidal activity of sodium dichloroisocyanurate, peroxygen and glutaraldehyde disinfectants against *Bacillus subtilis*. *J Hospital Infect.* 1996;32(4):283–94.
- Cone LA, Dreisbach L, Potts BE, Comness BE, Burleigh WA. *Bacillus cereus* endocarditis masquerading as an anthrax-like infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report. *J Heart Valve Dis.* 2005;4(1):37–9.
- Connolly AK, Waley SG. Characterization of the membrane  $\beta$ -lactamase in *Bacillus cereus* 569/H/9. *Biochemistry* 1983;22(20):4647–51.
- Čižman M. Smiselna uporaba antibiotikov. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M. eds. *Bolnišnična higiena*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 244–5.
- Dragaš AZ, Škerl M. Higiena in obvladovanje okužb. *Izbrana poglavja*. Ljubljana: ZRC SAZU; 2004: 23–9, 110–44.
- Dragaš AZ, Škerl M, Derganc M, Grosek Š, Müller Premru M, Filipič B, et al. Zunajčrevesne okužbe z *Bacillus cereus*. In: Dragaš AZ, ed. *Zbornik strokovnega srečanja Okužbe in zastrupitve prebavil*, Gozd Martuljek. Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije; 1997: 88–91.
- Dragaš AZ. Bolnišnične črevesne okužbe. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M. eds. *Bolnišnična higiena*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 84–8.
- Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(4):324–38.
- Dubois A, Bonnet A, Alvarez M, Bensafi H, Archambaud M, Chaminade B, et al. *Bacillus cereus* infections in traumatology-orthopaedics department. Retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J Infect.* 2005;50(1):22–30.
- Felici A, Amicosante G, Oratore A, Strom R, Ledent P, Joris B, et al. An overview of the kinetic parameters of class B  $\beta$ -lactamases. *Biochem J.* 1993;291(1):151–5.
- Gaspari L. Čiščenje bolnikove okolice v delokrogu zdravstvene-ga tehnika in višje medicinske sestre. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M. eds. *Bolnišnična higiena*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 191–2.
- Giffel te MC. Toxin production by *Bacillus cereus*. In: Tuijelaars ACJ, Samson RA, Rombouts FM, Notermans S, eds. *Stress response and virulence food microbiology and food safety into the next Millennium: proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICMH)*, Veldhoven, The Netherlands, 13–17 Sept. 1999. Zeist: Foundation Food Micro '99; 1999: 733–6.
- Ginsburg AS, Salazar LG, True LD, Disis ML. Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia. *Am J Hematol.* 2003;72(3):204–208.
- Granum PE, Lund T. Mini review: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;157(2):223–8.



22. Grosek Š, Moder B, Pretreska M, Primožič J, Derganc M, Dragaš AZ, et al. Bolnišnične okužbe pri otrocih v enoti za intenzivno zdravljenje. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M, eds. Bolnišnična higiena. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 80–83.
23. Hussain M, Carlino A, Madonna MJ, Lampen JO. Cloning and sequencing of the metalloprotein  $\beta$ -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1985;164(1): 223–9.
24. ISO 7932. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C. International Standard Organization; 2004: 7.
25. Jorgensen JH. Need for susceptibility testing guidelines for fastidious or less-frequently isolated bacteria. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(2):493–6.
26. Klun N. Živilni in vodo prenosljive okužbe. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M, eds. Bolnišnična higiena. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 89–94.
27. Kreigher A, Grile E, Blaško M, Praprotnik M, Klavs I, Kastelic Z, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 1999: letno poročilo. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2000: 28.
28. Kreigher A, Grile E, Blaško M, Praprotnik M, Klavs I, Kastelic Z, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2001: letno poročilo. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2002: 26.
29. Kreigher A, Grile E, Blaško M, Praprotnik M, Klavs I, Kastelic Z, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2005: letno poročilo. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2006: 41.
30. Kreigher A, Grile E, Blaško M, Praprotnik M, Klavs I, Kastelic Z, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2007: letno poročilo. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2008: 49.
31. Meena BS, Kapoor KN, Agarwal RK. Occurrence of multi-drug resistant *Bacillus cereus* in foods. *J Food Sci Technol.* 2000; 37(3):289–91.
32. Mori TM, Tokuhira Y, Takae Y, Mori S, Suzuki H, Abe T, et al. Successful non-surgical treatment of brain abscess and necrotizing fasciitis caused by *Bacillus cereus*. *Int Med.* 2002;41(8):671–3.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 11th informational supplement. M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2001.
34. Nielsen JB, Lampen JO.  $\beta$ -Lactamase III of *Bacillus cereus* 569: membrane lipoprotein and secreted protein. *Biochemistry.* 1983; 22(20):4652–6.
35. 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 Hospital Inf.* 2006;64(2):69–176.
36. Peng JS, Tsai WC, Chey CC. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol.* 2002; 77(1):11–8.
37. Roy A, Moktan B, Sarkar PK. Characteristics of *Bacillus cereus* isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food Control.* 2007;18(12):1555–64.
38. SAS/STAT User's Guide. SAS Online Doc®, Cary NC., USA: SAS Institute 2000; Version 8: Vol. 2.
39. Seme K, Poljak M. Mehanizmi odpornosti pri bakterijah, ki najpogosteje povzročajo bolnišnične okužbe. In: Musič D, ed. Zbornik predavanj. Ljubljana: Slovensko društvo za bolnišnično higieno; 2003: 11–7.
40. Strauss R, Mueller A, Wehler M, Neureiter D, Fischer E, Gramatzki M, et al. Pseudomembranous tracheobronchitis due to *Bacillus cereus*. *Clin Infect Dis.* 2001;33(5):E39–41.
41. Svensson B, Monthán A, Guinebretiére MH, Nguyen-Thé C, Christiansson A. Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. *Int Dairy J.* 2007;17(10):1201–8.
42. Teuber M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(9–10):755–63.
43. Veld, PH, Ritmeester WS, Delfgou-van Asch EHM, Dufrenne JB, Wernars K, Smit E, et al. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *Int J Food Microbiol.* 2001;64(1–2):63–70.
44. Vertelj A. Postopki s perilom. In: Gubina M, Dolinšek M, Škerl M, eds. Bolnišnična higiena. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2002: 184–6.