

Zastosowanie analizy makrorestrykcyjnej i reakcji PCR w odróżnianiu bezplazmidowych szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów przejściowych (*Bacillus sp. Ba 813*)

MARCIN NIEMCEWICZ, MICHAŁ BARTOSZCZE

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Niemcewicz M., Bartoszcze M.

Applying macro restriction analysis and PCR in differentiating plasmid cured strains of *Bacillus anthracis* from transitional strains (*Bacillus sp. Ba 813*)

Summary

The aim of the study was to use selected genetic analysis to differentiate plasmid cured strains of *Bacillus anthracis* from transitional strains (*Bacillus sp. Ba 813*). Two different research techniques (macro restriction analysis and PCR) were used and they confirmed that the PCR technique facilitated detecting the presence of the Ba 813 chromosomal sequence in both strains (plasmid cured *Bacillus anthracis* strain and *Bacillus sp. Ba 813*). This result indicated that applying the PCR method to differentiate plasmid cured *Bacillus anthracis* strains from *Bacillus sp. Ba 813* was not possible. The macro restriction method, however, facilitated a precise differentiation of plasmid cured *Bacillus anthracis* strains from transitional *Bacillus sp. Ba 813*.

Keywords: PFGE, macro restriction analysis, *Bacillus anthracis*, *Bacillus sp. Ba 813*

Bacillus anthracis jest Gram-dodatnią bakterią o kształcie laseczki, nie wykazującą ruchu, bezrzęskową, o wymiarach $1-1,5 \times 4-8 \mu\text{m}$. W zakażonym organizmie bakterie wytwarzają otoczkę, natomiast w środowisku zewnętrznym przy dostępie tlenu przekształcają się w przetrwalniki (spory), dzięki czemu są w stanie przetrwać w środowisku nawet kilkadziesiąt lat (10). Zjadliwe szczepy *Bacillus anthracis* posiadają dwa plazmidy pXO1 i pXO2, o wielkości, odpowiednio, 181,7 kb oraz 95 kb (16, 20). W plazmidzie pXO1 zlokalizowane są geny kodujące toksyny, natomiast w plazmidzie pXO2 otoczkę (18). Oprócz szczepów zjadliwych, występują również szczepy Sterne, posiadające tylko plazmid pXO1 (23, 24) oraz szczepy Pasteura z plazmidem pXO2 (3, 23). Toksyna węglkowa (kompleks toksyczny) zbudowana jest z trzech białek: EF – edema factor, PA – protective antigen oraz LF – lethal factor (7, 24). Geny kodujące toksynę noszą nazwy: pag (PA), lef (LF) oraz cya (EF) (25). Trzy geny znajdujące się w plazmidzie pXO2: cap A, cap B, cap C (20, 21) kodują D-glutaminową otoczkę chroniącą komórkę bakteryjną przed fagocytozą (13). Białka składające się na kompleks toksyczny produkowane są w logarytmicznej fazie wzrostu bakterii. PA w połączeniu z LF tworzy toksynę letalną, natomiast PA

w połączeniu z EF stanowi toksynę obrzęku (29). Wspomniane kompleksy PA–LF oraz PA–EF wywołują zmiany patologiczne i objawy charakterystyczne dla węglik. Oprócz szczepów Sterne i Pasteura występują szczepy *Bacillus anthracis* nie posiadające plazmidów (bezplazmidowe), które posiadają wspólne cechy z innymi przedstawicielami grupy *Bacillus cereus* (17), przez co mogą stwarzać problemy identyfikacyjne (19). Szczepy przejściowe (transitional) *Bacillus sp. Ba 813* są to szczepy *Bacillus cereus* i *Bacillus thuringiensis*, posiadające węglkowy marker chromosomalny Ba 813 (1, 18, 19, 21). Są one izolowane najczęściej z próbek ziemi pobieranej z miejsc padnięć zwierząt dotkniętych węglikiem (18). Pochodzenie szczepów przejściowych nie jest znane. Są zdania, że mogą one wywodzić się od *Bacillus anthracis* (18, 21).

Celem badań było określenie możliwości zastosowania metody makrorestrykcji do różnicowania bezplazmidowych szczepów *Bacillus anthracis* od przejściowych *Bacillus sp. Ba 813*.

Materiał i metody

Szczepy bakterii. Do badań wykorzystano bezplazmidowy szczep *Bacillus anthracis* (*Bacillus anthracis* 7700 –

pXO^(1-,2-), Ba 813⁺) oraz szczepy *Bacillus* sp. z obecnym markerem Ba 813 wyszczególnione w opisie rycin: 1, 2, 4.

Podłoże. Do namnażania wszystkich szczepów użytych w badaniach własnych zastosowano podłoże TSB Tryptic Soy Broth (Difco). Bufory. Użyto następujących buforów: bufor SE (25 mM EDTA, 75 M NaCl, pH 7,5), bufor TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA), bufor restrykcyjny S.A. (33 mM Tris acetate, 66 mM Potassium acetate, 10 mM Magnesium acetate, 0,5 mM dithiothreitol pH 7,9 Sigma), bufor PCR (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% żelatyna pH 8,3 Sigma), bufor TBE (Tris-Borate-EDTA Sigma), Mieszanina I (10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 mM NaCl, 0,2% Sodium Deoxycholate, 0,5% roztwór N-laurylo-sarkozylu, pH 7,4), Mieszanina II (1% roztwór N-laurylo-sarkozylu, 0,5 mM EDTA pH 9,5). Odczynniki i zestawy użyte w badaniach genetycznych. Enzymy restrykcyjne: NotI – sekwencja miejsca restrykcji GC ↓ GGCCGC (Sigma), SmaI – sekwencja miejsca restrykcji CCC ↓ GGG (Sigma).

Enzymy lityczne. Proteinaza K (Sigma), mutanolizyna (Sigma), lizozym (Sigma).

Polimeraza. REDTaq DNA Polymerase (Sigma). Nukleotydy: dNTP Mix (2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 2 mM TTP Sigma). Agarozy: CleanCut™ Agarose (Bio-Rad) do wytworzenia bloczków agarozowych, Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) do rozdzielania elektroforetycznego w zmiennym polu elektrycznym, PCR Routine Use Agarose (Sigma) do rozdzielania elektroforetycznego po reakcji PCR. Standardy wielkości: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), PFGE λ ladder (0,005-1 Mb) Concatemers of λ I 857 Sam 7 (Bio-Rad), Primery zastosowane w PCR wykrywające marker chromosomalny Ba 813:

R15' -TTAATTCACCTTGCAACTGATGGG-3',

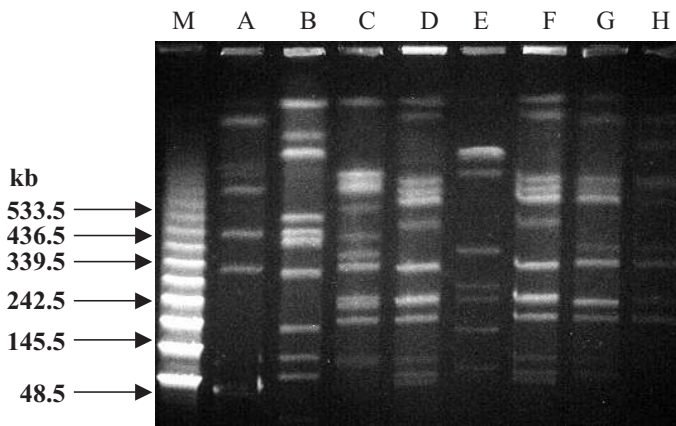
R25' -AACGATAGCTCCTACATTTGGAG-3' (Oligo).

Odczynniki. PMSF PhenylMethylSulfonyl Fluoride (Sigma), bromek etydy (Sigma), MgCl₂ (Sigma). Zestawy: zestaw do izolacji genomowego DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology) oraz CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad).

Metoda makrorestrykcji. Szczepy *Bacillus* namnażano na pożywce TSB. Do 2 ml pożywki w próbówce Falcon 15 przenoszono 5 µl zawiesiny z uprzednio przygotowanej, zamrożonej hodowli płynnej (mieszanina w stosunku 1 : 1, 18-godzinna hodowla z 50% glicerolem), którą inkubowano w temperaturze 37°C przy 200 obrotach (rpm) platformy inkubatora przez 18 godzin. Po tym czasie 75 µl hodowli przenoszono do 5 ml pożywki TSB w próbówce Falcon 50 i pozostawiono na 4 godziny w temperaturze 37°C, wytrząsając przy 200 obrotach platformy inkubatora. W celu oznaczenia gęstości optycznej hodowli zastosowano metodę OD₆₀₀ (Optical Density). Pomiaru dokonywano na spektrofotometrze firmy Pharmacia – Biotech, posługując się programem Basic, przy długości fali – 600 nm. Do pomiaru użyto 1 ml 4-godzinnej hodowli bakteryjnej zawieszony w kuwecie optycznej. Hodowle badanych szczepów doprowadzano rozcieńczając buforem SE do gęstości optycznej 0,5. Kontrolę negatywną stanowiło jałowe podłoże TSB, którego użyto do kalibracji urządzenia. Po 4 godzinach inkubacji 2,1 ml 4-godzinnej hodowli badanych szczepów *Bacillus* mieszano z 700 µl buforu SE. Zawiesi-

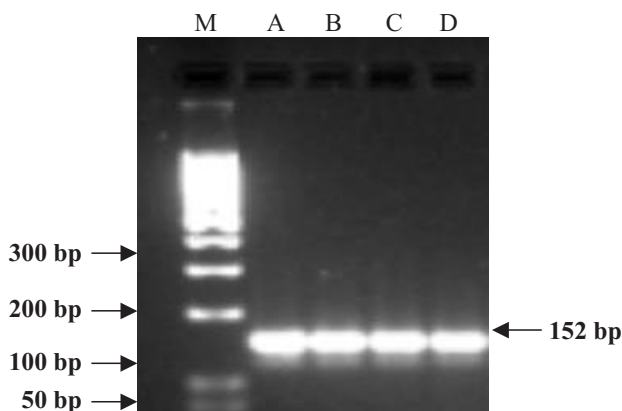
nę wirowano przy 3000 obrotach na minutę (rpm) przez 5 minut, po czym supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml buforu SE. Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Po trzecim wirowaniu i usunięciu supernatantu osad zawieszano w buforze SE, który zawierał 1 mg lizozymu oraz 25 jednostek (U) mutanolizyny. Następnie zawiesinę poddawano inkubacji w łaźni wodnej w temperaturze 50°C przez 15 minut. W tym samym czasie 2% CleanCut™ Agarose rozpuszczano w kuchence mikrofalowej, a następnie umieszczano w łaźni wodnej (aby zapobiec jej zestaleniu), w temperaturze 50°C na czas potrzebny do wykonania bloczków. Po inkubacji 75 µl zawiesiny mieszano z 75 µl 2% agarozy i za pomocą pipety przenoszono do foremek Disposable Plug Molds, które odstawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie na 15 minut w temperaturze 4°C w celu ochłodzenia i zestalenia się agarozy (wytworzenie bloczka agarozowego). Po 30 minutach z ramki bloczka agarozowego odklejano dolną warstwę papierową, wyjmowano bloczki, które przenoszono za pomocą metalowej szpatułki do probówek Falcon 15, do których dodawano mieszaninę I, zawierającą 0,5 mg/ml lizozymu oraz 25 U mutanolizyny. Bloczki agarozowe w probówkach inkubowano przez noc w temperaturze 37°C, po czym po usunięciu supernatantu bloczki przemywano 1 ml wody destylowanej przez 15 minut. Po jej odsączeniu do probówek zawierających bloczki agarozowe dodawano po 1 ml mieszaniny II, zawierającej 500 µg proteinazy K i pozostawiano w temperaturze 56°C na 48 godzin przy delikatnym wytrząsaniu (20 rpm). Po tym czasie mieszaninę II usuwano, a do probówek zawierających bloczki agarozowe dodawano po 1 ml dziesięciokrotnie rozcieńczonego buforu TE w celu wypłukania. Następnie bloczek agarozowy przenoszono do buforu TE zawierającego 1 mM roztworu PMSF na 1 godzinę w celu zahamowania działania proteazy serynowej (proteinaza K). Po tym okresie bloczek przemywano jeszcze trzykrotnie, dziesięciokrotnie rozcieńczonym roztworem buforu TE. Po przemyciu roztwór TE usuwano, a do bloczków agarozowych dodawano dziesięciokrotnie rozcieńczony roztwór buforu restrykcyjnego i pozostawiano je przy delikatnym wytrząsaniu (20 rpm) na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie bufor restrykcyjny usuwano, a do bloczków agarozowych dodawano bufor restrykcyjny zawierający 50 U enzymu restrykcyjnego (NotI, SmaI, SfiI) i umieszczano w optymalnej dla danego enzymu restrykcyjnego temperaturze (NotI – 25°C, SmaI – 37°C, SfiI – 56°C) na 18 godzin. Po tym czasie bufor restrykcyjny z dodatkiem enzymu usuwano, a bloczki agarozowe przepłukiwano rozcieńczonym dwudziestokrotnie buforem TE. Następnie bloczki agarozowe umieszczano w zagłębieniach w 1,2% żelu agarozowym za pomocą szpatułki laboratoryjnej. W zagłębieniu nr 1 umieszczano marker wielkości (Concatemers of λ I 857 Sam 7) λ ladder (0,005-1 Mb). Bloczki agarozowe poddawano elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym stosując: czas rozdzielania 20 godzin, temperaturę buforu (0,5 × TBE) 14°C, napięcie 6 V/cm, kąt reorientacji cząstek DNA – 120°, a czas zmiany napięcia 5-80 sekund. Po 20 godzinach rozdzielania elektroforetycznego żel barwiono roztworem bromku etydy.

DNA do reakcji PCR izolowano używając zestawu DNA Genomic Mini, zgodnie z zaleceniami producenta. Miesza-

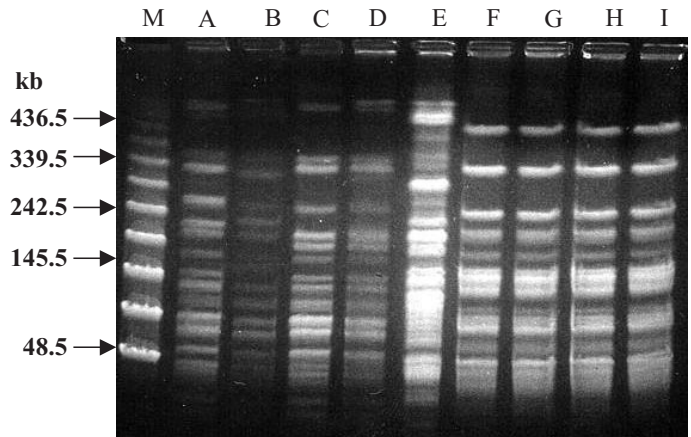


Ryc. 1. Wynik rozdziału elektroforetycznego w zmiennym polu elektrycznym szczepów z grupy *Bacillus cereus* po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego NotI, gdzie: M – marker wielkości Lambda ladder, A – *Bacillus sp. Ba 813 # 6*, B – *Bacillus sp. Ba 813 # 12*, C – *Bacillus sp. Ba 813 # 13*, D – *Bacillus sp. Ba 813 # 16*, E – *Bacillus anthracis 7700*, F – *Bacillus sp. Ba 813 # 17*, G – *Bacillus sp. Ba 813 # 14*, H – *Bacillus sp. Ba 813 # 15*.

ninę reakcyjną przygotowano w komorze bezpiecznej pracy mikrobiologicznej drugiej klasy. Skład mieszaniny: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1 μM primer R1, 1 μM primer R2, 1 U polimerazy, 100 ng DNA. Całość uzupełniano wodą destylowaną do końcowej objętości 50 μl. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze I-Cycler, posługując się następującym programem: wstępna denaturacja – 94°C przez 5 min., a następnie 35 cykli: denaturacja – 94°C – 30 sekund, przyłączanie – 58°C – 30 sekund, wydłużanie – 72°C – 30 sekund. Reakcję zakończono procesem końcowego wydłużania: 72°C przez 7 minut. Produkty PCR (10 μl) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym zawierającym 100 μg bromku etydyny w 100 ml buforu. Do przygotowania żelu oraz do elektroforezy użyto dwudziestokrotnego rozcieńczenia buforu TBE. Elektroforezę przeprowadzano na aparacie Blue Power Plus w czasie 1,5 go-



Ryc. 3. Wynik rozdziału elektroforetycznego po reakcji PCR z zastosowaniem primera sekwencji chromosomalnej Ba 813. M – marker wielkości 100 bp, A – *Bacillus anthracis 7700* (bezpłazmidowy szczep *Bacillus anthracis*), B – *Bacillus sp. Ba 813 # 6*, C – *Bacillus sp. Ba 813 # 15*, D – *Bacillus sp. Ba 813 # 17* (szczepy *Bacillus sp.* z obecną sekwencją chromosomalną Ba 813).

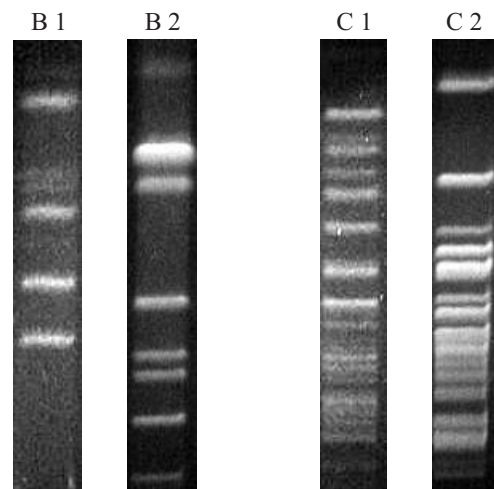


Ryc. 2. Wynik rozdziału elektroforetycznego w zmiennym polu elektrycznym szczepów z grupy *Bacillus cereus* po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego SmaI, gdzie: M – marker wielkości Lambda ladder, A – *Bacillus sp. Ba 813 # 15*, B – *Bacillus sp. Ba 813 # 17*, C – *Bacillus sp. Ba 813 # 19*, D – *Bacillus sp. Ba 813 # 21*, E – *Bacillus anthracis 7700*, F – *Bacillus sp. Ba 813 # 22*, G – *Bacillus sp. Ba 813 # 23*, H – *Bacillus sp. Ba 813 # 24*, I – *Bacillus sp. Ba 813 # 28*.

dziny, przy napięciu 80 V. Do rynienki pierwszej wprowadzono marker wielkości Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus w ilości 5 μl. Wynik reakcji PCR zapisywano przy pomocy systemu rejestracji żeli Image Master VDS.

Wyniki i omówienie

Przy użyciu techniki PCR (ryc. 3) u badanych szczepów (*Bacillus sp. Ba 813* oraz *Bacillus anthracis 7700*), wykryto obecność produktu amplifikacji o wielkości 152 bp. Natomiast metodą makrorestrykcji zarówno w przypadku enzymu restrykcyjnego NotI (ryc. 1, 4), jak i enzymu SmaI (ryc. 2, 4) stwierdzono znaczne różnice we wzorach restrykcyjnych pomiędzy szczepami *Bacillus sp. Ba 813*, a bezpłazmidowym szczepem *Bacillus anthracis 7700*. Ponadto stwierdzono



Ryc. 4. Wynik rozdziału elektroforetycznego w zmiennym polu elektrycznym szczepu *Bacillus anthracis 7700* oraz *Bacillus sp. Ba 813 # 6* po zastosowaniu restrykcji enzymami SfiI, NotI, SmaI. B 1, B 2 – enzym NotI, B 1 – *Bacillus sp. Ba 813 # 6*, B 2 – *Bacillus anthracis 7700*, C 1, C 2 – enzym SmaI, C 1 – *Bacillus sp. Ba 813 # 6*, C 2 – *Bacillus anthracis 7700*.

identyczność wzorów restrykcyjnych pomiędzy niektórymi szczepami *Bacillus sp. Ba 813* (ryc. 2).

W wyniku przeprowadzonych badań metodą PCR u obydwu szczepów, zarówno *Bacillus anthracis*, jak i *Bacillus sp. Ba 813* stwierdzono obecność sekwencji chromosomalnej Ba 813, w związku z czym nie może być ona stosowana do odróżniania bezplazmidowych szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów *Bacillus sp. Ba 813*. W przeciwieństwie do wyników otrzymanych metodą PCR, użycie metody makrorestrykcji pozwoliło na odróżnienie szczepów *Bacillus sp. Ba 813* od bezplazmidowego szczepu *Bacillus anthracis*. Uzyskane wzory restrykcyjne bezplazmidowego szczepu *Bacillus anthracis* znacznie różnią się od wzorów restrykcyjnych szczepów *Bacillus sp. Ba 813*, zarówno przy zastosowanym enzymie restrykcyjnym NotI, jak i SmaI. Należy wspomnieć, że marker Ba 813 nie jest jedynym markerem chromosomalnym stosowanym w odróżnianiu *Bacillus anthracis* od innych szczepów z grupy *Bacillus cereus*. Do innych markerów należą, między innymi: SG-850, vrrA, vrrB, vrrC, CG3, rpoB (8, 19). Marker Ba 813 do niedawna uważany był za wysoce specyficzny dla *Bacillus anthracis* (17, 21), jednak ostatnio wykazano, że jest on także obecny u szczepów innych gatunków z grupy *Bacillus cereus* (1, 18, 19), podobnie jak marker rpoB (19). Znane są również szczepy *Bacillus anthracis*, nie posiadające sekwencji rpoB (19). Także markery: vrrA, vrrB, vrrC, CG3 (8, 12, 26) stosowane w reakcji tandemowych powtórzeń (VNTR – Variable-Number Tandem Repeats) okazały się nieprzydatne, gdyż wszystkie pięć grup VNTR wykryto wśród szczepów *Bacillus sp.* (18). Markerem chromosomalnym wykorzystywanym do odróżnienia *Bacillus anthracis* od innych gatunków z grupy *Bacillus cereus* jest również marker SG-850 (2), jednak otrzymany w wyniku reakcji amplikon o wielkości 838 bp (2) wykazują również szczepy z gatunku *Bacillus cereus* i *Bacillus thuringiensis* (2). W niniejszych badaniach nie stosowano innych metod genetycznych, opartych na reakcji PCR, gdyż np. metoda multiplex PCR, z primerami skierowanymi na wykrycie obecności genów kodujących cechy zjadliwości, zlokalizowanych w plazmidzie pXO1 (lef – czynnik letalny, cya – czynnik obrzęku, pag – antygen ochronny PA) oraz plazmidzie pXO2 (cap – otoczka) (20), pozwala tylko na identyfikację i odróżnianie zjadliwych od niezjadliwych szczepów *Bacillus anthracis*, posiadających minimum jeden plazmid. W przypadku badania szczepów bezplazmidowych odróżnienie ich metodą multiplex PCR jest niemożliwe. Wykryto ponadto zjadliwe szczepy *Bacillus anthracis*, u których w reakcji PCR nie stwierdzono obecności sekwencji cap lub lef (30). Należy wspomnieć, że brak możliwości wykrycia tych genów nie oznacza braku zdolności tych szczepów do ekspresji czynników toksycznych.

Odróżnianie *Bacillus anthracis* na podstawie obecności plazmidów może stwarzać trudności także z po-

wodu transferu plazmidów zachodzącego pomiędzy szczepami *Bacillus sp.* (9, 21). Przykładem tego jest ekspresja plazmidowych genów *Bacillus anthracis* u *Bacillus subtilis* (29), możliwość naturalnej utraty pXO2 przez *Bacillus anthracis* (30) oraz horyzontalny transfer plazmidów występujący naturalnie u *Bacillus cereus* i *Bacillus thuringiensis* (28). W przypadku PCR-RFLP, rybotypowania oraz ERIC-PCR stwierdzono występowanie szczepu *Bacillus anthracis* o identycznym profilu genetycznym jak *Bacillus cereus* (23). Szczepy *Bacillus cereus* nie mogą być odróżnione od *Bacillus anthracis* również metodą AFLP, ze względu na swoje podobieństwo genetyczne do *Bacillus anthracis* (19). Podobnie metody rybotypowania 16S rRNA (6, 15) oraz 16S – 23S ITS (9) są zawodne z uwagi na mały polimorfizm genetyczny pomiędzy *Bacillus anthracis* a pozostałymi bakteriami z grupy *Bacillus cereus* (19). Do odróżniania szczepów *Bacillus sp.* od *Bacillus anthracis* oraz szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów *Bacillus sp. Ba 813* (1) można wykorzystać metodę LR-REP PCR (Long-Range Repetitive Element Polymorphism). Przewagą PFGE nad LR REP-PCR jest jednak możliwość (ze względu na charakterystyczny i unikalny wzór fragmentów restrykcyjnych *Bacillus anthracis*) (5) obserwacji zmian zachodzących w chromosomie na skutek samoistnej lub spowodowanej ingerencją człowieka mutacji. Polega ona na utworzeniu lub utraceniu miejsca restrykcji na skutek insercji bądź delecji fragmentu DNA (27). Metodę analizy makrorestrykcyjnej wykorzystywano z sukcesem w badaniach wielu gatunków bakterii (4, 5, 11, 14), dzięki czemu można było obserwować zjawiska ewolucyjne, śledzić dynamikę kolonizacji (4), przeprowadzać dochodzenie epidemiologiczne (4, 22) i kliniczne (11, 14). Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach są powtarzalne, a wzorce restrykcyjne, jak wykazano, pozwalają na odróżnienie szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów *Bacillus sp. Ba 813*.

Podsumowanie

Analiza makrorestrykcyjna jest metodą pozwalającą na różnicowanie bezplazmidowych szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów przejściowych *Bacillus sp. Ba 813*. Może być stosowana w badaniach identyfikacyjnych *Bacillus anthracis* jako metoda weryfikacyjna wyników wątpliwych dotyczących w szczególności szczepów przejściowych.

Piśmienictwo

1. Brumlik M. J., Szymajda U., Zakowska D., Liang X., Redkar R. J., Patra G., DelVecchio V. G.: Use of Long-Range Repetitive Element Polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3021-3028.
2. Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R., Sorlini C.: A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1298-1303.
3. Green B. D., Battisti L., Koehler T. M., Thorne C. B., Ivins B. E.: Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 1985, 49, 291-297.

4. Hansen S. M., Uldbjerg N., Kilian M., Sørensen U. B. S.: Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in woman during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 83-89.
5. Harrell L. J., Andersen G. L., Wilson K. H.: Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1847-1850.
6. Hoa N. T., Baccigalupi L., Huxham A., Smertenko A., Van P. H., Ammendola S., Ricca E., Cutting S. M.: Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 5241-5247.
7. Kaspar R. L., Robertson D. L.: Purification and physical analysis of *Bacillus anthracis* plasmids pXO1 and pXO2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987, 149, 362-368.
8. Keim P., Price L. B., Klevytska A. M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E.: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 182, 2928-2936.
9. Ko K. S., Kim J.-M., Kim J.-W., Jung B. Y., Kim W., Kim I. J., Kook Y.-H.: Identification of *Bacillus anthracis* by rpoB sequence analysis and multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 2908-2914.
10. Koehler T. M., Dai Z., Kaufman-Yarbray M.: Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* 1994, 176, 586-595.
11. Laureiro M. M., de Moraes B. A., Quadra M. R. R., Pinheiro G. S., Suffys P. N., Asensi M. D.: Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000, 95, 777-782.
12. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoel F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G.: A tandem repeats database for bacterial genomes: application the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiology* 2001, 1:2.
13. Little S. F., Knudson G. B.: Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infect. Immun.* 1986, 52, 509-512.
14. Martins-Loureiro M., de Moraes B. A., de Mendonca V. L.-F., Rocha-Quadra M. R., dos Santos-Pinheiro G., Dutra-Asensi M.: Molecular epidemiology of extended-spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2001, 43, 88-95.
15. Merrill L., Richardson J., Kuske C. R., Dunbar J.: Fluorescent heteroduplex assay for monitoring *Bacillus anthracis* and close relatives in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 3317-3326.
16. Patra G., Fouet A., Vaissaire J., Guesdon J.-L., Mock M.: Variation in rRNA operon number as revealed by ribotyping of *Bacillus anthracis* strains. *Research in Microbiology* 2002, 153, 139-148.
17. Patra G., Sylvestre P., Ramisse V., Thérasse J., Guesdon J.-L.: Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1996, 672, 1-8.
18. Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M.: Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3412-3414.
19. Qi Y., Patra G., Liang X., Williams L. E., Rose S., Redkar R. J., Del-Vecchio V. G.: Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3720-3727.
20. Ramisse V., Patra G., Garrigue H., Guesdon J.-L., Mock M.: Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters* 1996, 145, 9-16.
21. Ramisse V., Patra G., Vaissaire J., Mock M.: The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 224-228.
22. Schoonmaker D., Heimberger T., Birkhead G.: Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1491-1498.
23. Shangkuan Y.-H., Yang J.-F., Lin H.-C., Shaio M.-F.: Comparison of PCR-RFLP, ribotyping, and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 452-462.
24. Singh Y., Ivins B. E., Leppla S. H.: Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 1998, 66, 3447-3448.
25. Sirard J.-C., Mock M., Fouet A.: Molecular tools for the study of transcriptional regulation in *Bacillus anthracis*. *Res. Microbiol.* 1995, 146, 729-737.
26. Smith K. L., DeVos V., Bryden H., Price L. B., Hugh-Jones M. E., Keim P.: *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 3780-3784.
27. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.
28. Thomas D. J. I., Morgan A. W., Whipps J. M., Saunders J. R.: Plasmid Transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and Dipteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 330-338.
29. Thwaite J. E., Baillie L. W. J., Carter N. M., Stephenson K., Rees M., Harwood C. R., Emmerson P. T.: Optimization of the cell wall micro-environment allows increased production of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *B. subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 227-234.
30. Turnbull P. C. B., Hutson R. A., Ward M. J., Jones M. N., Quinn C. P., Finnie N. J., Duggleby C. J., Kramer J. M., Melling J.: *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J. Bacteriol.* 1992, 72, 21-28.

Adres autora: dr Marcin Niemcewicz, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy