

Zastosowanie analizy makrorestrykcyjnej do różnicowania wybranych szczepów z grupy *Bacillus cereus*

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 in differentiating selected strains of the *Bacillus cereus* group

Summary

The aim of the study was to apply macro-restriction analysis in order to differentiate selected strains of the *Bacillus cereus* group. Three different restriction enzymes (SfiI, NotI and SmaI) were used during the research process and it was confirmed that SmaI is the best restriction enzyme applied in macrorestriction analysis of the *Bacillus cereus* group. The study used 89 *Bacillus cereus* group strains, and an identical restriction pattern generated by restriction enzymes was confirmed among 23 of the studied *Bacillus anthracis* strains. Two groups of strains (four and two strains) among 19 *Bacillus* sp. Ba 813 and three groups (three, two and two strains) among 44 strains of *Bacillus thuringiensis* showed identical restriction profiles. The similarity of studied strains was ascertained on the basis of the Dice coefficient, and confirmed that strains showing the same restriction profiles were identical (100% similarity). The similarity between the remaining strains of the *Bacillus cereus* group and the *Bacillus anthracis* strains oscillated between 20% to 78.6%, while the similarity of these strains to each other oscillated from 15.4% to 100%. Dendrograms were also constructed using the UPGMA method.

Keywords: PFGE, macrorestriction, *Bacillus cereus*

Według klasyfikacji Bergeya (6), bakterie z rodziny *Bacillaceae* rodzaju *Bacillus* dzieli się na dwie grupy: tlenowców oraz beztlenowców. W 1980 roku członkowie komitetu ICSPSTBRO (International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of *Bacillus* and Related Organisms) zatwierdzili nowy podział taksonomiczny bakterii z rodzaju *Bacillus*, ustanawiając nową grupę w obrębie rodzaju *Bacillus* obejmującą: *Bacillus cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* oraz *Bacillus anthracis*, nadając jej nazwę – grupa *Bacillus cereus* (8). Niektórzy autorzy sugerują nawet, że *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus anthracis* należą do jednego gatunku (17). Bakterie z grupy *Bacillus cereus* są tlenowymi laseczkami (4). Naturalnym środowiskiem występowania tych bakterii jest gleba (15). Dla człowieka oraz zwierząt wybitnie chorobotwórczy jest tylko jeden gatunek – *Bacillus anthracis*, czynnik etiologiczny węglik. *Bacillus cereus* może produkować emetyki i enterotoksyny, które są częstym powodem psucia się chleba, mąki i przetworów mącznych, a jego produkty metaboliczne mogą być przyczyną zatrucia pokarmowych u ludzi (18). *Bacillus weihenstephanensis* są to psychrotolerancyjne szczepy *Bacillus cereus*. *Bacillus thuringiensis* wykazuje chorobotwórczość jedynie dla owadów (4), natomiast *Bacillus*

mycoides uważany jest za bakterię wspomagającą proces wegetacji roślin (11).

Szczepy przejściowe (transitional) *Bacillus* sp. Ba 813 są to szczepy *Bacillus cereus* i *Bacillus thuringiensis*, posiadające w swoim chromosomie węglikowy marker chromosomalny Ba 813 (8, 24-26). Są one izolowane najczęściej z prób ziemi pobieranej z miejsc padnięć zwierząt dotkniętych węglikiem (26). Posiadają one sekwencję chromosomalną Ba 813 o wielkości 277 bp, charakterystyczną dla szczepów *Bacillus anthracis* (29). Pochodzenie szczepów przejściowych nie jest znane. Są zdania, że mogą one wywodzić się od *Bacillus anthracis* (26, 29).

Analizę makrorestrykcyjną wykorzystywano w badaniach genetycznych wielu bakterii, między innymi z rodzajów: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Legionella* i innych (1, 7, 13, 20, 22, 30). Metoda ta znalazła praktyczne zastosowanie w dochodzeniu epidemiologicznym *E. coli* O157:H7 w 1993 roku w USA. (36). Jedyną dostępną publikacją dotyczącą wykorzystania analizy makrorestrykcyjnej w badaniach nad *Bacillus anthracis* jest praca Harrell i wsp. (15). Jednak badaniom poddano tylko trzy szczepy *Bacillus anthracis*. Carlson i wsp. (9) wykorzystali tę metodę w badaniu całego genomu *Bacillus cereus*, two-

rzając wirtualną mapę chromosomu badanej bakterii. Liu i wsp. (22) wykorzystali tę metodę w dochodzeniu epidemiologicznym schorzeń wywołanych przez *Bacillus cereus*. Ustalenie przydatności analizy makrorestrykcyjnej w typowaniu molekularnym tej grupy bakterii może stanowić ważny element w udoskonalaniu procedur diagnostycznych, zarówno w aspekcie potrzeb zdrowotnych, jak i w dochodzeniu epidemiologicznym oraz kryminalnym.

Celem badań było:

- określenie przydatności enzymów restrykcyjnych SfiI, NotI i SmaI w analizie makrorestrykcyjnej szczepów *Bacillus anthracis* i pozostałych szczepów z grupy *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*) oraz szczepów przejściowych *Bacillus sp. Ba 813*;
- porównanie wzorów restrykcyjnych szczepów *Bacillus anthracis*: Sterne (pXO1^{+/2}-, Ba813+), Pasteura (pXO1^{-/2}+, Ba813+), szczepów bezplazmidowych (pXO1^{-/2}-, Ba813+) oraz u pozostałych badanych szczepów z grupy *Bacillus cereus*;
- analiza podobieństwa badanych szczepów na podstawie współczynnika Dice.

Materiał i metody

Szczepy bakterii. Do badań wykorzystano 89 szczepów z grupy *Bacillus cereus*, z czego 23 stanowiły szczepy *Bacillus anthracis* (szczepy zarówno Sterne, Pasteura, jak i bezplazmidowe), 44 *Bacillus thuringiensis*, 19 *Bacillus sp. Ba 813* oraz 3 szczepy *Bacillus cereus*.

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-sarkozyłu, pH 7,4). Mieszanina II (1% roztwór N-laurylo-sarkozyłu, 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). Agarozy: CleanCut™ Agarose (Bio-Rad) do wytworzenia bloczków agarozowych, Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) do rozdziału elektroforetycznego w zmiennym polu elektrycznym. Standardy wielkości: PFGE λ ladder (0,005-1 Mb) Concatemers of λ I 857 Sam 7 (Bio-Rad). Odczynniki: PMSF PhenylMethylSulfonyl Fluoride (Sigma), bromek etydyny (Sigma), MgCl₂ (Sigma). Zestawy: 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 zawieszanej w kiuwecie optycznej. Hodowle badanych szczepów doprowadzono rozcieńczając buforem SE do gęstości optycznej 0,5. Kontrolę negatywną stanowiło jałowe podłoże TSB, które użyto do kalibracji urządzenia. Po 4 godzinach inkubacji 2,1 ml 4-godzinnej hodowli badanych szczepów *Bacillus* mieszano z 700 μl buforu SE. Zawiesinę 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 czas 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 próbek Falcon 15, do których dodawano mieszaninę I, zawierającą 0,5 mg/ml lizozymu oraz 25 U mutanolizyny. Bloczki agarozowe w próbkach 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 próbek zawierających bloczki agarozowe dodawano po 1 ml mieszaniny II, zawierającej 500 μg proteiny K i pozostawiano w temperaturze 56°C na 48 godzin przy delikatnym wytrząsaniu (20 rpm). Po tym czasie mieszaninę II usuwano, a do próbek 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 aga-

rozowym za pomocą szpatułki laboratoryjnej. W zagłębieniu nr 1 umieszczano marker wielkości (Concatemers of λ I 857 Sam 7) λ ladder (0,005-1 Mb). Błoczki agarozowe poddawano elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym, stosując: czas rozdziału 20 godzin, temperaturę buforu ($0,5 \times$ TBE) 14°C , napięcie 6 V/cm , kąt reorientacji cząstek DNA – 1200, a czas zmiany napięcia 5-80 sekund. Po 20 godzinach rozdziału elektroforetycznego żel barwiono roztworem bromku etydyny.

Wyniki analizowano opierając się na pracy Tenovera i wsp. (33) oraz porównując je przy pomocy programu Quantity One. Podobieństwo (Similarity) obliczono na podstawie współczynnika Dice (20), a metodą UPGMA zestawiono zbiory wzorów restrykcyjnych o największym podobieństwie i wyrażono to graficznie w postaci dendrogramu:

$$F = \frac{2 n_{xy}}{(n_x + n_y)}$$

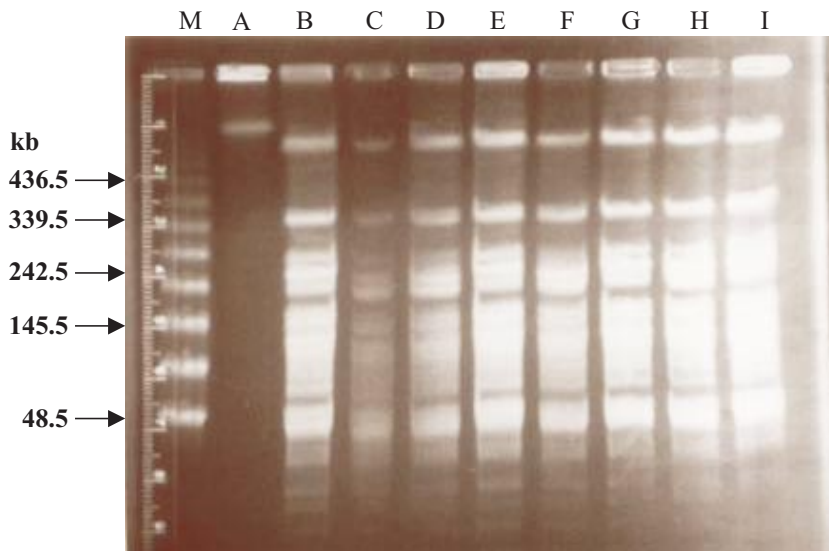
n_x – liczba powstałych fragmentów restrykcyjnych szczepu x,

n_y – liczba powstałych fragmentów restrykcyjnych szczepu y,

n_{xy} – liczba fragmentów identycznych szczepów x i y.

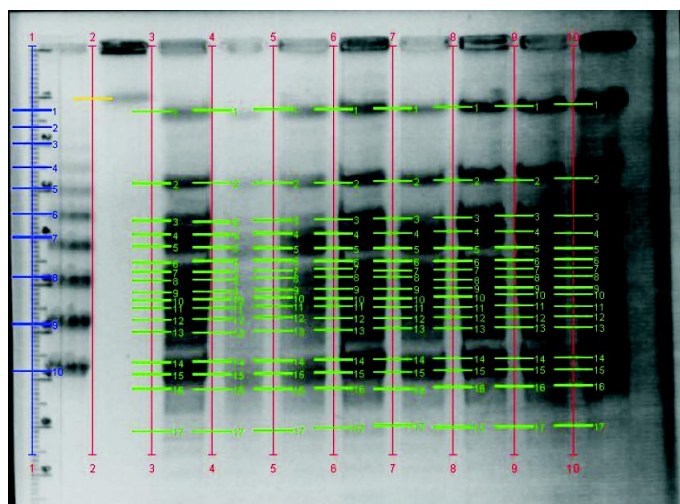
Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych analiz, przy użyciu enzymu SfiI, otrzymano trzy fragmenty restrykcyjne szczepów *Bacillus anthracis*. Wielkość fragmentów restrykcyjnych szczepów *Bacillus anthracis* wahała się od 436 kb do powyżej 630 kb. Po zastosowaniu enzymu NotI otrzymano osiem fragmentów restrykcyjnych u szczepów *Bacillus anthracis*. Wielkość fragmentów restrykcyjnych wynosiła od 48 kb do powyżej 630 kb. Po zastosowaniu enzymu SmaI otrzymano siedemnaście fragmentów restrykcyjnych szczepów *Bacillus anthracis*. Wielkość fragmentów restrykcyjnych wynosiła od 48 kb do powyżej 436 kb (ryc. 1). Przy analizie szczepów z grupy *Bacillus cereus* enzymem SfiI, otrzymano od trzech do pięciu, w zależności od gatunku fragmentów restrykcyjnych. Wielkość fragmentów restrykcyjnych wahała się od 48 kb do powyżej 630 kb. W przypadku NotI enzym ten generował od pięciu do czternastu fragmentów restrykcyjnych o wielkości od 48 kb do powyżej 533 kb. Enzymem SmaI w tych badaniach otrzymano: od 12 do 20 fragmentów restrykcyjnych u *Bacillus sp. Ba 813* i od 15 do 19 u *Bacillus cereus* oraz od 14 do 21 u *Bacillus thuringiensis*. Ich wielkość wahała się od 48 kb do powyżej 436 kb. Po zastosowaniu pierwszego enzymu – SfiI, u szczepów bezplazmidowych, szczepów posiadających tylko pierwszy plazmid oraz tylko drugi plazmid stwierdzono identyczną wielkość otrzymanych fragmentów restrykcyjnych. Przy użyciu enzymu NotI stwierdzono brak różnic w powstałych fragmentach restrykcyjnych, u bezplazmidowych szczepów *Bacillus anthracis*, jak i posiadających pierwszy plazmid oraz tylko drugi plazmid. Po działaniu enzy-



Ryc. 1. 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* # 25, B – *Bacillus anthracis* A 60, C – *Bacillus anthracis* 044, D – *Bacillus anthracis* 041, E – *Bacillus anthracis* A 19, F – *Bacillus anthracis* AC 2, G – *Bacillus anthracis* A 18, H – *Bacillus anthracis* 067, I – *Bacillus anthracis* Vollum

mu SmaI otrzymane fragmenty były również o identycznej wielkości u wszystkich szczepów *Bacillus anthracis*, zarówno u bezplazmidowych (*Bacillus anthracis* Vollum, *Bacillus anthracis* 067), jak i u szczepów Sterne, u których występuje tylko pierwszy plazmid: *Bacillus anthracis* 044, *Bacillus anthracis* 041, *Bacillus anthracis* AC 2 oraz szczepów Pasteura, z obecnym tylko drugim plazmidem: *Bacillus anthracis* A 60, *Bacillus anthracis* A 18, *Bacillus anthracis* A 19 (ryc. 2). Przy porównywaniu wzorów restrykcyjnych *Bacillus*



Ryc. 2. Wynik wykrywania fragmentów restrykcyjnych szczepów z grupy *Bacillus cereus* po analizie makrorestrykcyjnej z zastosowaniem enzymu SmaI, gdzie: 1 – marker wielkości Lambda ladder, 2 – *Bacillus sp. Ba 813* # 25, 3 – *Bacillus anthracis* A 60, 4 – *Bacillus anthracis* 044, 5 – *Bacillus anthracis* 041, 6 – *Bacillus anthracis* A 19, 7 – *Bacillus anthracis* AC 2, 8 – *Bacillus anthracis* A 18, 9 – *Bacillus anthracis* 067, 10 – *Bacillus anthracis* Vollum

1as (Raw 1-D Image)

Calculation Method: Dice Coefficient

May 4, 2004

Lane	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
9	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

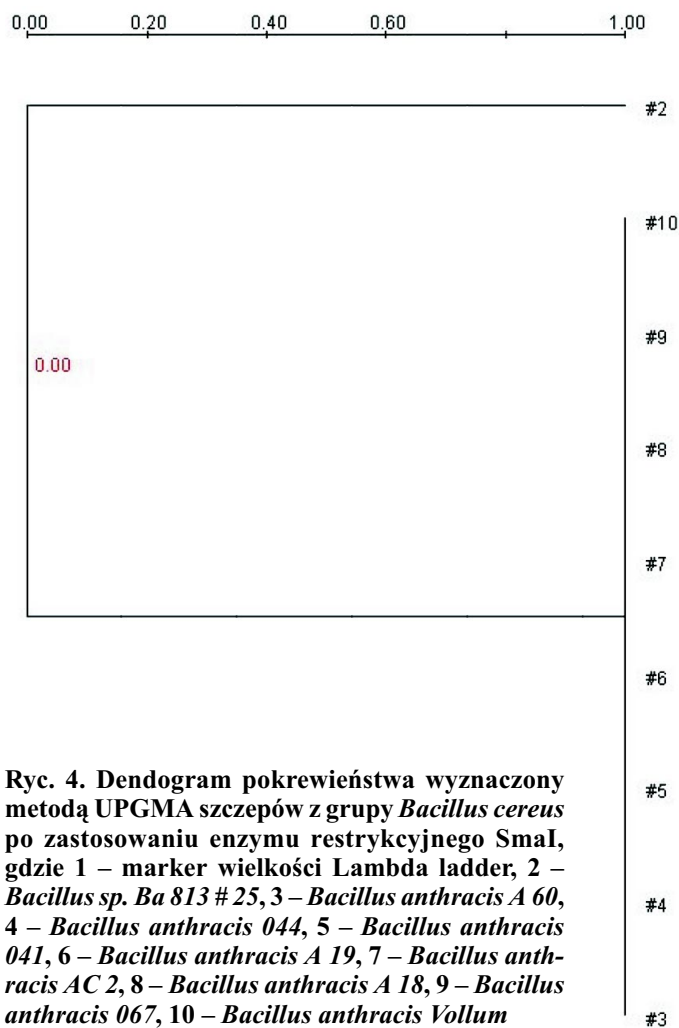
Ryc. 3. Wyniki badań podobieństwa na podstawie współczynnika Dice szczepów z grupy *Bacillus cereus* po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego SmaI, gdzie: 1 – marker wielkości Lambda ladder, 2 – *Bacillus sp. Ba 813 # 25*, 3 – *Bacillus anthracis A 60*, 4 – *Bacillus anthracis 044*, 5 – *Bacillus anthracis 041*, 6 – *Bacillus anthracis A 19*, 7 – *Bacillus anthracis AC 2*, 8 – *Bacillus anthracis A 18*, 9 – *Bacillus anthracis 067*, 10 – *Bacillus anthracis Vollum*

anthracis z wzorami pozostałych badanych szczepów zastosowano enzym SmaI. Stwierdzono, że występuje jeden szczep *Bacillus thuringiensis* i jeden *Bacillus cereus*, które różnią się od *Bacillus anthracis* sześcioma fragmentami. Pozostałe badane szczepy z grupy *Bacillus cereus* różnią się od *Bacillus anthracis* więcej niż sześcioma (od siedmiu do czternastu) fragmentami restrykcyjnymi. Po porównaniu wzorów restrykcyjnych u badanych szczepów z grupy *Bacillus cereus* stwierdzono:

– identyczne wzory restrykcyjne między niektórymi badanymi szczepami *Bacillus thuringiensis* oraz u niektórych *Bacillus sp. Ba 813*; różnicę trzech fragmentów restrykcyjnych między 5 szczepami *Bacillus thuringiensis*; różnicę czterech fragmentów restrykcyjnych między 3 szczepami: *Bacillus sp. Ba 813*; różnicę sześciu fragmentów restrykcyjnych między niektórymi szczepami: *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus sp. Ba 813*. Jednak większość z badanych szczepów różniła się więcej niż sześcioma fragmentami restrykcyjnymi.

Podobieństwo szczepów *Bacillus anthracis* na podstawie współczynnika Dice (41) obliczono w oparciu o program Quantity One. Otrzymano 100% podobieństwa pomiędzy wszystkimi szczepami *Bacillus anthracis*, zarówno bezplazmidowymi, jak i Sterne oraz Pasteura (ryc. 3). Podobieństwo pozostałych szczepów do *Bacillus anthracis* wahało się od 20% do 78,6%. Także podobieństwo tych szczepów względem siebie wynosiło od 15,4% do 100%. Podobieństwo między badanymi szczepami *Bacillus anthracis* ilustruje dendrogram (ryc. 4).

W celu identyfikacji bakterii z grupy *Bacillus cereus* stosowane są klasyczne metody bakteriologiczne, biochemiczne, biologii molekularnej oraz inne (np. spektrometria masowa). Do metod klasycznych należą, między innymi,



Ryc. 4. Dendrogram pokrewieństwa wyznaczony metodą UPGMA szczepów z grupy *Bacillus cereus* po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego SmaI, gdzie 1 – marker wielkości Lambda ladder, 2 – *Bacillus sp. Ba 813 # 25*, 3 – *Bacillus anthracis A 60*, 4 – *Bacillus anthracis 044*, 5 – *Bacillus anthracis 041*, 6 – *Bacillus anthracis A 19*, 7 – *Bacillus anthracis AC 2*, 8 – *Bacillus anthracis A 18*, 9 – *Bacillus anthracis 067*, 10 – *Bacillus anthracis Vollum*

dzy innymi, testy serologiczne oraz badanie wrażliwości na bakteriofagi (2). Stosowanie tych metod jest jednak ograniczone z powodu braku na rynku surowic diagnostycznych. Test fagowy nie daje pewnych wyników z uwagi na występowanie szczepów opornych na stosowane fagi (12), a metody biochemiczne – PhP (PhenePlate system), API system (23), są przydatne diagnostycznie zwłaszcza do badań skринingowych. Stosowane są także inne metody, jak na przykład technika spektrometrii masowej – MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization), oparta na laserowym odczycie obecności specyficznych dla danej bakterii markerów białkowych (16). Pozwala ona, między innymi, na rozróżnienie grupy *Bacillus cereus* od innych bakterii *Bacillus sp.*, ale odróżnienie tą metodą wewnątrz grupy *Bacillus cereus* wciąż jest niemożliwe (31). Wyniki uzyskane dzięki wspomnianym technikom powinny być jednak weryfikowane metodami genetycznymi (23).

Do metod stosowanych w analizie genetycznej grupy *Bacillus cereus* należą: multiplex PCR (28), PCR-RFLP, rybotypowanie (32), ERIC-PCR (32), LR-REP PCR (8), AFLP (34), FAFLP ze znakowanymi karboksyfluoresceiną primerami (18), analiza amplifikacji fragmentu 16S rRNA (19) oraz badanie pokrewieństwa genetycznego, opartego na metodzie fingerprintingu (odcisk palca) fragmentu 16S-23S ITS (Intergenic

Transcribed Spacers) rybosomalnego operonu (10), typowanie plazmidowe (plasmid fingerprinting), analiza enzymatyczna MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) (17), analiza chromosomalnego wzorca restrykcyjnego (PFGE) (15, 24, 25). W badaniach własnych zastosowano technikę CHEF (Contour – Clamped Homogeneous Electric Fields) ze względu na jej dużą zdolność separacyjną (do 7000 kb) (5, 21), którą niektórzy autorzy wykorzystali przy badaniu innych rodzajów bakterii (7, 13, 14, 30). Badania własne rozpoczęto od określenia przydatności enzymów restrykcyjnych. Z kryteriów oceny przydatności enzymów restrykcyjnych w analizie makrorestrykcyjnej, zaproponowanych przez Tenovera i współpracowników (33), wynika, że enzym restrykcyjny musi generować przynajmniej dziesięć fragmentów restrykcyjnych, gdyż w przeciwnym razie interpretacja wyników staje się trudna, a nawet niemożliwa (33). W świetle własnych badań enzym SfiI generował trzy fragmenty restrykcyjne *Bacillus anthracis*, NotI osiem, a SmaI siedemnaście, w związku z tym do dalszych badań wybrano tylko enzym SmaI. W przypadku pozostałych szczepów z grupy *Bacillus cereus*, w niektórych przypadkach również enzym NotI generował powyżej dziesięciu fragmentów restrykcyjnych, jednak tylko u 30% przebadanych szczepów *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* oraz *Bacillus sp. Ba 813*. Biorąc to pod uwagę, enzym ten powinien być stosowany w tej metodzie jedynie jako enzym alternatywny. W badaniach własnych do interpretacji wyników wykorzystano kryteria pokrewieństwa zaproponowane przez Tenovera i wsp. (33), z uwagi na istnienie bliskiego pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* oraz *Bacillus thuringiensis*, co wykazał Helgason i wsp. (17). Przy porównaniu wzorów restrykcyjnych badanych szczepów z grupy *Bacillus cereus*, w oparciu o te kryteria można je zaszeregować do grupy szczepów identycznych, posiadających tę samą liczbę fragmentów o tej samej wielkości, grupy szczepów blisko spokrewnionych (jedna różnica genetyczna), grupy szczepów prawdopodobnie spokrewnionych (dwie różnice genetyczne), w których szczepy różnią się czterema, pięcioma lub sześcioma fragmentami restrykcyjnymi, przy identycznej wielkości pozostałych, grupy szczepów niespokrewnionych (trzy i więcej różnic genetycznych), przy których liczba różnic we wzorze restrykcyjnym szczepów jest większa od sześciu.

Na podstawie wspomnianych kryteriów dotyczących liczby uzyskiwanych fragmentów restrykcyjnych badanych szczepów (33) porównania dokonano tylko w oparciu o analizę enzymem SmaI. W tym świetle wzory restrykcyjne generowane przez szczepy *Bacillus anthracis*, zarówno Sterne, Pasteura, jak i bezplazmidowe świadczą o ich identyczności. Zgodnie z założeniami Tenovera i wsp. (33), należy przyjąć, iż szczepy *Bacillus thuringiensis* oraz *Bacillus cereus* różniące się od *Bacillus anthracis* 6 fragmentami mogą być prawdopodobnie z nim spokrewnione. Szczepy te były izo-

lowane od pacjentów, u których występowały objawy chorobowe (objawy grypopodobne oraz posocznica bakteryjna). Można by domniemywać, że wszystkie szczepy z grupy *Bacillus cereus* nie należące do *Bacillus anthracis*, a wywołujące objawy chorobowe prawdopodobnie mogą być z nim spokrewnione. Potwierdzeniem tej sugestii może być wykazane duże podobieństwo genetyczne do *Bacillus anthracis* szczepów *Bacillus cereus* izolowanych z przypadków zapalenia przyzębia (27). Dalsze badania własne dotyczące porównania wzorów restrykcyjnych między pozostałymi badanymi szczepami z grupy *Bacillus cereus* z użyciem enzymu restrykcyjnego SmaI, dały możliwość rozróżnienia poszczególnych szczepów, a także stwierdzenie ich identyczności, bliskiego lub prawdopodobnego pokrewieństwa. Kierując się tymi przesłankami, z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że niektóre szczepy *Bacillus sp. Ba 813* są szczepami *Bacillus thuringiensis*. Pozostałe badane szczepy różnią się między sobą więcej niż sześcioma fragmentami restrykcyjnymi, co świadczy o braku pokrewieństwa między nimi. Wykazane w niniejszej pracy różnice we fragmentach restrykcyjnych, mogą być wykorzystywane nie tylko w celach diagnostycznych, ale również w dochodzeniach epidemiologicznych, przy analizie geograficznego rozprzestrzeniania się szczepów oraz występowaniu ognisk chorobowych wywoływanych szczepami chorobotwórczymi, a nie będącymi *Bacillus anthracis* (22). Przy analizie podobieństwa badanych szczepów na podstawie współczynnika Dice (20), dokonano interpretacji wyników w oparciu o pracę Huang i wsp. (20), biorąc pod uwagę tylko te szczepy, które spełniały kryteria pokrewieństwa wg Tenovera i wsp. (33). Założono, że szczepy z podobieństwem: poniżej 50% i różnicą 8-7 fragmentów restrykcyjnych oraz 50%-60% i różnicą 7-6 fragmentów restrykcyjnych nie są spokrewnione. Natomiast z podobieństwem 60%-68% i różnicą 6-5 fragmentów restrykcyjnych, 68%-75% i różnicą 5-4 fragmentów restrykcyjnych oraz 75%-80% i różnicą 4-3 fragmentów restrykcyjnych są prawdopodobnie spokrewnione. Blisko spokrewnione są przy podobieństwie 80%-90% i różnicy 3-2 fragmentów restrykcyjnych oraz powyżej 90% i różnicy 2-1 fragmentów restrykcyjnych. Szczepy są identyczne przy podobieństwie 99%-100% i braku różnic we wzorze restrykcyjnym. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie identyczności wszystkich dwudziestu trzech badanych szczepów *Bacillus anthracis*, co wskazuje na ich monomorfizm genetyczny. Wśród badanych czterdziestu czterech szczepów *Bacillus thuringiensis* obserwowano trzy grupy (trzy, dwa i dwa szczepy) identycznych szczepów, a spośród dziewiętnastu szczepów *Bacillus sp. Ba 813* dwie grupy (cztery i dwa szczepy). Bliskie pokrewieństwo stwierdzono między dwoma szczepami: *Bacillus sp. Ba 813*, a także między jednym szczepem *Bacillus thuringiensis* a *Bacillus sp. Ba 813*. Prawdopodobne pokrewieństwo obserwowano między szczepami: *Bacillus anthracis* oraz jednym szczepem *Bacil-*

lus thuringiensis i jednym *Bacillus cereus*, między czterema szczepami *Bacillus sp. Ba 813*, ośmioma *Bacillus thuringiensis*. Innych badanych szczepów z grupy *Bacillus cereus* pomimo podobieństwa powyżej 60% nie analizowano z powodu większej liczby niż sześć różnicy fragmentów restrykcyjnych między sobą.

Metodę analizy makrorestrykcyjnej wykorzystywano z sukcesem w badaniach wielu gatunków bakterii (7, 13, 14, 30), dzięki czemu można było obserwować zjawiska ewolucyjne, śledzić dynamikę kolonizacji (14), przeprowadzać dochodzenie epidemiologiczne (14, 30) i kliniczne (1, 13). Wyniki uzyskiwane w niniejszej pracy są powtarzalne, różnicujące szczepy z grupy *Bacillus cereus*, a wzorce restrykcyjne, co wykazano w pracy, pozwalają na odróżnienie szczepów *Bacillus anthracis* od szczepów *Bacillus sp. Ba 813*. Te walory uzasadniają postawienie wniosku, że analiza makrorestrykcyjna jest „złotym standardem” w typowaniu molekularnym bakterii (3), w tym również bakterii z grupy *Bacillus cereus*.

Podsumowanie

Analiza makrorestrykcyjna jest metodą pozwalającą na różnicowanie szczepów bakterii z grupy *Bacillus cereus*. Z przebadanych enzymów (SfiI, NotI i SmaI), jedynie enzym SmaI jest enzymem najbardziej przydatnym w analizie makrorestrykcyjnej szczepów zarówno *Bacillus anthracis*, jak i pozostałych szczepów z grupy *Bacillus cereus*. Wszystkie 23 badane szczepy *Bacillus anthracis* cechowały się monomorfizmem genetycznym. Przebadane szczepy *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* oraz *Bacillus sp. Ba 813* cechuje duży polimorfizm genetyczny.

Piśmiennictwo

1. Agvald-Öhman C., Lund B., Edlund C.: Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care* 2004, 8, R42-R47.
2. Ahmed R., Sankar-Mistry P., Jackson S., Ackermann H.-W., Kasatiya S. S.: *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 636-640.
3. Antonishyn N. A., McDonald R. R., Chan E. L., Horsman G., Woodmansee C. E., Falk P. S., Mayhall C. G.: Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4058-4065.
4. Aronson A. I., Beckman W., Dunn P.: *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Rev.* 1986, 50, 1-24.
5. Basim E. H., Basim H.: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turk. J. Biol.* 2001, 25, 405-418.
6. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Wyd. IX, Williams and Wilkins Company. Baltimore 1994.
7. Blanc D. S., Struelens M. J., Deplano A., De Ryck R., Hauser P. M., Petignat C., Francioli P.: Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3442-3445.
8. 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.
9. Carlson C. R., Kolstø A.-B.: A small (2.4 Mb) *Bacillus cereus* chromosome corresponds to a conserved region of a larger (5.3 Mb) *Bacillus cereus* chromosome. *Molec. Microbiol.* 1994, 13, 161-169.
10. Cherif A., Borin S., Rizzi A., Ouzari H., Boudabous A., Daffonchio D.: *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 33-40.
11. 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.
12. Ezzell Jr. J. W., Abshire T. G., Little S. F., Lidgerding B. C., Brown C.: Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 223-231.
13. Gouby A., Carles-Nurit M.-J., Bouziges N., Bourg G., Mesnard R., Bouvet P. J. M.: Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1588-1591.
14. 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.
15. Harrell L. J., Andersen G. L., Wilson K. H.: Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1847-1850.
16. Hathout Y., Demirev P. A., Ho Y.-P., Bundy J. L., Ryzhov V., Sapp L., Stutler J., Jackman J., Fenselau C.: Identification of *Bacillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4313-4319.
17. Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.-B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2627-2630.
18. Hill K. K., Ticknor L. O., Okinaka R. T., Asay M., Blair H., Bliss K. A., Laker M., Pardington P. E., Richardson A. P., Tonks M., Beecher D. J., Kemp J. D., Kolstø A.-B., Lee Wong A. C., Keim P., Jackson P. J.: Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 1068-1080.
19. 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 bacteriophage therapy of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 5241-5247.
20. Huang E. T. S., Chu Y.-W., Ng T.-K., Cheng A. F. B.: Study of the relatedness of isolates of *Shigella flexneri* and in 1994 and 1995 from Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2404-2407.
21. Lai E., Birren B. W., Clark S. M., Simon M. I., Hood L.: Pulsed field gel electrophoresis. *BioTechniques* 1989, 7, 34-42.
22. Liu P. Y.-F., Ke S.-C., Chen S.-L.: Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 1533-1535.
23. Möllby R., Kühn I., Katouli M.: Computerised biochemical fingerprinting – a new tool for typing of bacteria. *Rev. Med. Microbiol.* 1993, 4, 231-241.
24. Niemcewicz M., Patra G., Redkar R., DelVecchio V. G.: Utilization of the NotI and SmaI *Bacillus anthracis* pulsotype patterns as chromosomal signature. *Mat. Nauk. Konf.: Protection against Biological Threats*, Warszawa 2001, s. 73.
25. Patra G. P., Niemcewicz M., Zakowska D., DelVecchio V. G.: Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the whole genome organization in the *Bacillus cereus* group of Bacteria. 4th Internat. Conf. Anthrax, Annapolis, Maryland, USA, 2001, Abstract Book 22.
26. 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.
27. Radnedge L., Agron P. G., Hill K. K., Jackson P. J., Ticknor L. O., Keim P., Andersen G. L.: Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 2755-2764.
28. Ramiš 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.
29. Ramiš 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.
30. Rennie R. P., Strong D., Taylor D. E., Salama S. M., Davidson C., Tabor H.: *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony: epidemiological observations and typing of the causative organism. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 721-724.
31. Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C.: Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3828-3834.
32. Shangkuan Y.-H., Yang J.-F., Lin H.-C., Shiao 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.
33. 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.
34. Zwet W. C. Van Der, Parlevliet G. A., Savelkoul P. H., Stoof J., Kaiser A. M., Van Fourth A. M., Vandenbroucke-Grauls C. M.: Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4131-4136.

Adres autora: dr Marcin Niemcewicz, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy;
e-mail: marcinniem@obw-wihe.pulawy.pl