

# Fenotypisk og genetisk kartlegging av *Bacillus cereus*-gruppeisolater fra Etosha National Park, Namibia

*Isolering og karakterisering av nye stammer  
med likhet til Bacillus anthracis*

Morten Søndena



Masteroppgave ved Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai, 2014



# **Fenotypisk og genetisk kartlegging av Bacillus cereus-gruppeisolater fra Etosha National Park, Namibia**

## ***Isolering og karakterisering av nye stammer med likhet til Bacillus anthracis***

Av Morten Søndena

Masteroppgave ved Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo  
Mai 2014

© Morten Søndena

2014

Fenotypisk og genetisk kartlegging av *Bacillus cereus*-gruppeisolater fra Etosha National Park, Namibia - Isolering og karakterisering av nye stammer med likhet til *Bacillus anthracis*

Morten Søndena

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

*B. cereus*-gruppen inneholder miltbrannbakterien *B. anthracis*, insektpatogenet *B. thuringiensis*, matforgiftningsbakterien *B. cereus* i tillegg til artene *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* og *B. cytotoxicus*. De tre førstnevnte artene utgjør en svært nært beslektet gruppe bakterier basert på kromosomale markører, men kan vanligvis skilles fra hverandre basert på morfologiske og fenotypiske trekk; *B. anthracis* danner store, irregulære kolonier med røff tekstur og bakteriecellene vokser vanligvis sammen i lange kjeder. Stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* danner generelt mindre, sirkulære kolonier, og cellene vokser vanligvis enkeltvis eller parvis. *B. anthracis* er non-motil og følsom for penicillin, mens *B. cereus* og *B. thuringiensis* er typisk motile og penicillinresistente. Selv om *B. cereus* er en relativt ufarlig bakterie for voksne personer med normal immunstatus, er det oppdaget tilfeller av miltbrann-lignende sykdom forårsaket av *B. cereus*. Slike isolater innehar plasmider som ligner *B. anthracis* sine virulensplasmider pXO1 og pXO2, som koder for henholdsvis miltbrantoksin og kapsel. Det kromosomale genet *plcR* som koder for en positiv pleiotrop transkripsjonsregulator av ekstracellulære virulensfaktorer fins på kromosomet til alle medlemmer av *B. cereus*-gruppen. Alle kjente *B. anthracis*-stammer har imidlertid en nonsens-mutasjon i *plcR*-genet som fører til et trunkert og inaktivt polypeptid, mens de øvrige medlemmene av *B. cereus*-gruppen har generelt et funksjonelt *plcR*-gen.

I denne studien har isolater av *B. cereus/thuringiensis* som er anrikt fra jordprøver hentet fra områder rundt *B. anthracis*-infiltrerte sebrakadaver etter miltbrannutbrudd i Etosha National Park (Namibia) blitt undersøkt for morfologiske, fenotypiske og genotypiske likhetstrekk til *B. anthracis*. Isolatene er karakterisert på bakgrunn av celle- og kolonimorfologi, samt motilitet og penicillinfølsomhet. Isolatene ble også screenet for tilstedeværelse av pXO1- og pXO2-lignende plasmider, og pulsfelt gelelektroforese ble utført på utvalgte isolater for å karakterisere størrelsen på eventuelle plasmider. *plcR*-genet ble sekvensert for utvalgte isolater og benyttet for å undersøke om nonsensmutasjonen funnet i *B. anthracis* er til stede, samt i kartlegging av isolatenes likhet til miltbrann-patogenet, mhp dette genet.

Mange av isolatene i studien ble funnet å ha flere likhetstrekk til *B. anthracis*, men disse likhetstrekkene korrelerte ikke nødvendigvis med isolatenes fylogenetiske slektskap til *B. anthracis* basert på kromosomal MLST. Isolatene FFIBCgr36 og 46 er svært nært beslektet med *B. anthracis* basert på kromosomale markører, men hadde ingen andre likhetstrekk til

miltbrannbakterien for øvrig. Vi har oppdaget et spesielt interessant isolat, FFIBCgr121, som innehar pXO1- og pXO2-lignende plasmider, med tilhørende virulensgener for miltbranntoksin og kapsel, og potensielt funksjonell PlcR. Isolatet kan representere det første isolatet med disse egenskapene som noen gang er beskrevet.

# Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved Forsvarets Forskningsinstitutt (FFI) på Kjeller og Universitetet i Oslo i perioden oktober 2013-mai 2014, under veiledning av Jaran Strand-Olsen og Ole Andreas Økstad. Masteroppgavens størrelse var på 45 studiepoeng, og kvalifiserer til graden Master i Farmasi.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, som hjalp en stakkars student som knapt viste bak frem på en PCR-maskin med å dra denne oppgaven i land. Ewa Jaroszewicz var en stor hjelp under arbeidet på Blindern, og Tone Aarskaug bidro med uvurderlig assistanse under arbeidet på FFI.

Til slutt sender jeg en stor takk til Ellen Guldborg for mang en gang å ha fikset meg fri fra jobb på kort varsel, og ikke minst til Signe Lindbråten for å stille med biffmiddag når moralen var lavest.

15. mai 2014

Morten Søndena

# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Slekten <i>Bacillus</i> .....	1
1.2	<i>Bacillus cereus</i> -gruppen .....	1
1.2.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	3
1.2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	5
1.2.3	<i>Bacillus anthracis</i> .....	7
1.3	PlcR .....	13
1.4	<i>B. cereus</i> -stammer som forårsaker miltbrann-lignende sykdom .....	15
1.4.1	<i>B. cereus</i> CI og <i>B. cereus</i> CA.....	15
1.4.2	<i>B. cereus</i> G9241 og andre .....	16
1.5	Taksonomiske utfordringer i <i>B. cereus</i> -gruppen .....	18
1.6	Plasmider .....	19
1.6.1	pXO1- og pXO2-lignende plasmider .....	20
1.7	Målet med studien .....	22
1.7.1	Preseleksjon av isolater til studien .....	22
2	Material og metoder .....	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Bakterieisolater.....	23
2.1.2	Primere .....	25
2.1.3	Reagenser .....	25
2.1.4	Enzymer .....	26
2.1.5	Størrelsesmarkører .....	26
2.1.6	Kit.....	26
2.1.7	Annet .....	26
2.2	Løsninger og vekstmedier .....	26
2.2.1	Løsninger.....	26
2.2.2	Vekstmedier .....	30
2.3	Metoder.....	31
2.3.1	Analyse av koloni- og celled morfologi.....	31
2.3.2	Motilitetstest.....	31
2.3.3	Penicillinfølsomhetstest .....	31



2.3.4	DNA-ekstraksjon.....	32
2.3.5	PCR-screening.....	32
2.3.6	Sekvensering av PCR-produkter .....	34
2.3.7	Agarose gelelektroforese.....	36
2.3.8	Pulsfelt gelelektroforese.....	37
3	Resultater.....	39
3.1	Koloni- og cellemorfologi .....	39
3.1.1	Kolonimorfologi.....	39
3.1.2	Lysmikroskopi.....	42
3.2	Motilitet og penicillinfølsomhet .....	47
3.3	pXO1- og pXO2-lignende plasmider .....	48
3.4	Pulsfeltgelelektroforese .....	52
3.5	Sekvensering av <i>plcR</i> .....	53
4	Diskusjon.....	56
4.1	Morfologisk og fenotypisk karakterisering .....	56
4.1.1	Morfologi .....	56
4.1.2	Hemolyse, motilitet og penicillinresistens .....	58
4.1.3	Identifisering av isolater som <i>B. thuringiensis</i> .....	59
4.2	Plasmider .....	59
4.2.1	pXO1- og pXO2-lignende plasmider .....	59
4.2.2	PFGE.....	62
4.3	<i>plcR</i> .....	62
4.4	Samlede resultater.....	64
4.5	Videre arbeid .....	66
5	Konklusjon .....	68
6	Vedlegg .....	69
6.1	Vedlegg 1: Primerpar forsøkt brukt til sekvensering av <i>plcR</i> .....	69
	Litteraturliste .....	71

# Figurer og tabeller

## Figurer

Figur 1: Fylogenetisk slektstre av <i>B. cereus</i> -gruppen .....	3
Figur 2: <i>B. anthracis</i> sin livssyklus .....	8
Figur 3: PlcR-funksjon .....	14
Figur 4: Fylogenetisk slektskap mellom pXO1-lignende plasmider .....	21
Figur 5: Amplifiserte regioner av <i>plcR</i> .....	35
Figur 6: 1 kb Plus DNA Ladder størrelsesmarkør .....	36
Figur 7: Elektrodeplassing pulseltgelelektroforese .....	37
Figur 8: Lambdaladder størrelsesmarkør .....	38
Figur 9: Mikroskopibilder .....	46
Figur 10: Agarose gelelektroforese <i>repA</i> .....	51
Figur 11: Agarose gelelektroforese pXO1-58 .....	51
Figur 12: Agarose gelelektroforese <i>repX</i> .....	51
Figur 13: Resultat fra pulselt gelelektroforese .....	52
Figur 14: Agarose gelelektroforese <i>plcR-4</i> og <i>plcR-7</i> .....	53
Figur 15: Sammenligning av <i>plcR</i> -nukleotidsekvens ved <i>B. anthracis</i> mutasjonspunkt .....	54
Figur 16: Fylogenetisk tre <i>plcR</i> .....	55
Figur 17: Sammenligning av <i>plcR</i> -nukleotidsekvens ved <i>B. cereus</i> CI mutasjonspunkt .....	55
Figur 18: Fylogenetisk slektstre av <i>B. cereus</i> -gruppen inkludert isolater fra denne studien .....	57

## Tabeller

Tabell 1: Bakteriestammer brukt i studien .....	23
Tabell 2: Primere brukt i studien .....	25
Tabell 3: Kolonimorfologi FFIBCgr1-85 .....	40
Tabell 4: Cellemorfologi FFIBCgr1-85 .....	43
Tabell 5: Motilitet og penicillinfølsomhet FFIBCgr1-85 .....	47
Tabell 6: pXO1- og pXO2-lignende plasmider FFIBCgr1-147 .....	49

# 1 Innledning

## 1.1 Slekten *Bacillus*

Slekten *Bacillus* består av gram-positive, stavformede, fakultativt aerobe, sporedannende bakterier med variabelt G+C-innhold (33-78 %) (Garbeva et al. 2003). Slekten *Bacillus* er underlagt fylumet *Firmicutes*, klassen *Bacilli*, ordenen *Bacillales* og familien *Bacillaceae* (Fritze 2004). Slekten inneholder 148 godkjente arter (McIntyre et al. 2008), og representerer et genus av *Bacilli*-klassen med stor genetisk variasjon (Garbeva et al. 2003). Det er foreslått at slekten skal snevres inn til kun to undergrupper: *Bacillus subtilis*-gruppen og *Bacillus cereus*-gruppen, og alle de andre artene i slekten *Bacillus* blir reklassifisert i nye slekter (Bhandari et al. 2013). Isolater fra slekten kan finnes i store deler av miljøet, fra ekstrem kulde til varme områder, og fra sure til basiske omgivelser. Medlemmer av slekten er vanlige jordorganismer, hvor de har en konkurransefordel på grunn av sin evne til å danne sporer som respons mot ugunstige vekstbetingelser. Slike sporer finnes i nesten alle omgivelser, og viable *bacillus*-sporer skal ha blitt funnet i en bie som var fossilert i rav for 25-40 millioner år siden (Pepper og Gentry 2002). De fleste medlemmene i slekten *bacillus* er non-patogene, og patogenisitet innenfor slekten er hovedsakelig en egenskap hos artene i undergruppen *Bacillus cereus*-gruppen, spesielt fordi gruppen inneholder arten *Bacillus anthracis*.

## 1.2 *Bacillus cereus*-gruppen

*Bacillus cereus*-gruppen (også kalt *Bacillus cereus sensu lato*) inneholder artene; *B. cereus* (*sensu stricto*), *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* og *B. cytotoxicus* (Guinebretiere et al. 2013). Tre av artene i gruppen anses som opportunistiske eller obligate patogener mot insekter eller pattedyr, mens de andre vanligvis anses som non-patogene; *B. cereus* er en vanlig matforgiftningsorganisme (Drobniowski 1993), *B. thuringiensis* er et kjent insektpatogen (Schnepf et al. 1998) og *B. anthracis* forårsaker sykdommen miltbrann (antraks), som er svært dødelig for pattedyr, inkludert mennesker (Koehler 2009). Til tross for at noen av artene anses som non-patogene, er gener som koder for enterotoksinkomponenter og degraderende enzymer som vanligvis er assosiert med *B. cereus*-forårsaket matforgiftning også funnet i stammer fra flere av de andre artene i *B. cereus*-gruppen, inkludert *B. weihenstephanensis* og *B. mycoides*. Dette antyder at

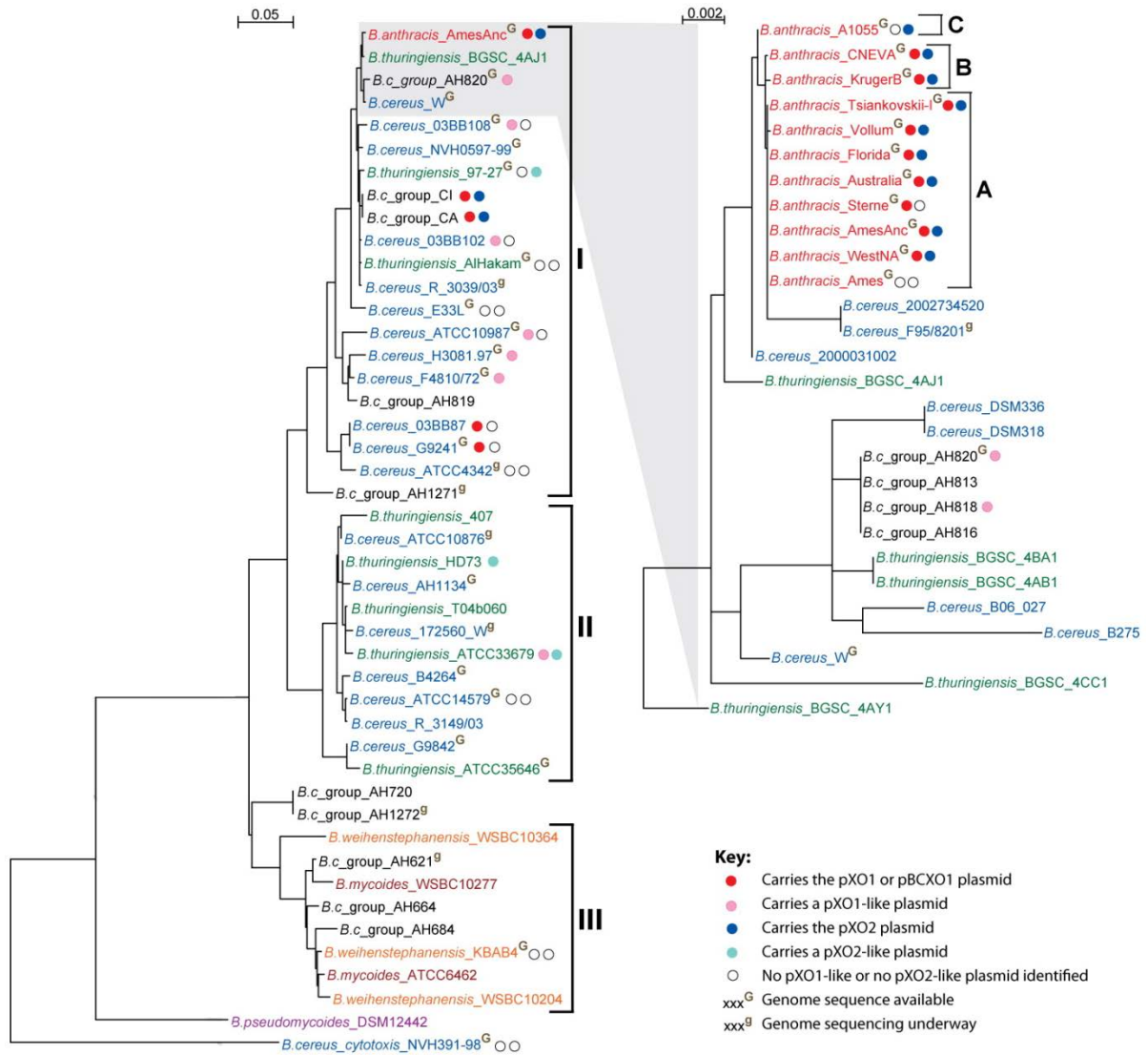
organismer fra *B. cereus*-gruppen generelt kan ha potensiale til å være patogene (Hendriksen et al. 2006). For å underbygge dette har både *B. mycoides* og *B. weihenstephanensis* vært koblet til matbåren sykdom i mennesker (McIntyre et al. 2008, Thorsen et al. 2006, Lechner et al. 1998), og *B. cytotoxicus* ble først isolert fra et alvorlig utbrudd av matforgiftning som forårsaket tre dødsfall (Lapidus et al. 2008, Lund et al. 2000).

Organismene i *B. cereus*-gruppen har et kromosom i størrelsesorden 5,2-5,5 mb, med unntak av isolatene av *B. cytotoxicus*, som er den evolusjonsmessig mest fjernt beslektede arten i gruppen og har et kromosom på 4,1 mb (Lapidus et al. 2008). Gjennomsnittlig G+C-innhold til artene i gruppen er 35,3 % (Ivanova et al. 2003). Kromosomene til medlemmene i gruppen er òg vist å være relativt konserverte, både med hensyn på geninnhold og genrekkefølge (Rasko et al. 2005). Det er identifisert et kjernesett med gener, på 3000 +/- 200 av de totalt ca. 5000 genene et typisk *B. cereus*-gruppekromosom består av. Hver stamme i gruppen har 400-800 stammespesifikke gener, som potensielt er involvert i nisjetilpassingsprosesser. Dette bidrar til et relativt stort pangenom<sup>1</sup> for *B. cereus*-gruppen med 20-25 000 gener (Lapidus et al. 2008). Ulike genetiske studier av artene i *B. cereus*-gruppen har vist at *B. cereus*, *B. thuringiensis* og *B. anthracis* er svært nært beslektet på kromosomalt nivå, og mange mener at artene bør anses som én art (Helgason et al. 2000b, Maughan og Van der Auwera 2011, Tourasse et al. 2006). Multilokus sekvensstyping (MLST<sup>2</sup>)-studier av i *B. cereus*-gruppen har vist at de kan deles inn i tre subgrupper (Figur 1). Subgruppe I inneholder alle kjente *B. anthracis*-stammer, samt flere *B. cereus*- og *B. thuringiensis*-stammer – hvor flere er assosiert med humane infeksjoner. Subgruppe II inneholder *B. cereus*- og *B. thuringiensis*-stammer fra en rekke ulike kilder, inkludert matforgiftningshendelser, mens subgruppe III inneholder *B. weihenstephanensis* og *B. mycoides*. Utenfor disse tre gruppene finner man isolater de mer fjernt beslektede artene *B. pseudomycoides* og *B. cytotoxicus* (Økstad og Kolstø 2011). Det er foreslått at artene i gruppen kan deles inn i syv undergrupper basert på økotypisk populasjonsstruktur, som inkluderer molekylære og fenotypiske data (Guinebretiere et al. 2008).

---

<sup>1</sup> Det samlede settet med gener på tvers av alle medlemmene i *B. cereus*-gruppen.

<sup>2</sup> Studier av genetisk slektsforhold mellom ulike bakteriestammer/-arter basert på sekvensering av husholdningsgener.



**Figur 1.**

Slektskapet mellom artene i *B. cereus*-gruppen basert på MLST-analyser, hentet fra Kolstø et al. 2009.

*B. cereus*, *B. thuringiensis* og *B. anthracis* er langt mer studert enn de øvrige medlemmene i *B. cereus*-gruppen, på grunn av deres patogene egenskaper og nære slektskap til hverandre.

### 1.2.1 *Bacillus cereus*

*B. cereus* (*sensu stricto*) er en vanlig jordorganisme, som kan isoleres fra mange typer jord, sedimenter, støv og planter. Siden *B. cereus* lett isoleres fra jordprøver har man ment at dette er organismens primærnisje (Rasko et al. 2005), men det er òg foreslått at gastrointestinalesystemet til virvelløse dyr er *B. cereus* sitt naturlige habitat (Margulis et al.

1998, Jensen et al. 2003), da man her ofte finner *B. cereus*, både som sporer og vegetative celler (Rasko et al. 2005). *B. cereus* germinerer, deler seg, og sporulerer i jord avhengig av miljøbetingelsene (Arnesen et al. 2008).

*B. cereus* regnes som en relativt ufarlig art, men er likevel vanlig i forbindelse med human matforgiftning i tillegg til ulike opportunistiske infeksjoner og sykehusinfeksjoner (Bottone 2010). Bakterien kan gi to ulike former for matforgiftning, samt sjeldne tilfeller av lokal eller systemisk sykdom som endoftalmitt, endokarditt, meningitt, osteomyelitt og periodontitt (Bottone 2010). Tilfeller av *B. cereus* assosiert med sårinfeksjon og sepsis er sjeldne, men et økt antall infeksjoner i pasienter med nedsatt immunstatus er dokumentert (Bottone 2010). *B. cereus*-assosiert matforgiftning kommer i to varianter: diare- eller emetisk sykdom (Arnesen et al. 2008). På grunn av sine adhesive endosporer, spres de lett til de fleste typer mat. I tillegg har *B. cereus* evnen til å danne biofilm som bidrar til organismens egenskap til å kontaminere utstyr som brukes i matindustrien, og igjen fører til kontaminering av matprodukter (Arnesen et al. 2008). *B. cereus* kan derfor isoleres fra et stort utvalg matvarer og ingredienser, som ris, meieriprodukter (spesielt melk), krydder, tørket mat og grønnsaker. Videre kan krysskontaminering bidra til å spre sporene videre til annen mat, inkludert kjøttprodukter (Arnesen et al. 2008).

### ***B. cereus*-assosiert matforgiftning**

*B. cereus*-forårsaket diare forårsakes av cytotoxinene hemolysin BL (Hbl), nonhemolytisk enterotoksin (Nhe) og cytotoxin K (CytK), som er forhånds dannet i matvaren eller dannes i forbindelse med vegetativ vekst i vertens tynntarm (Bottone 2010). *Nhe* er det vanligste enterotoksingenet, og fins sannsynligvis i alle artene i *B. cereus*-gruppen (Arnesen et al. 2008). Diareesykdommen inntreffer vanligvis 8-16 timer etter inntak av kontaminert mat, og avtar vanligvis innen 12 timer – uten behov for medisinsk behandling (Drobniewski 1993).

Matforgiftning forårsaket av den emetiske varianten av *B. cereus* skyldes det varmemestabile, nonribosomalt-syntetiserte dodecadepsi-peptidet cereulid, som er et nevrotoxin (Bottone 2010). Cereulid kodes i genclusteret *ces* (Ehling-Schulz et al. 2005), lokalisert på det 270kb store plasmidet pCER270 (Hoton et al. 2005), som har stor homologi til *B. anthracis*-toksinplasmidet pXO1 (Ehling-Schulz et al. 2006). Cereulid er ekstremt varmemestabilt, og er aktivt selv etter autoklivering (Agata et al. 1996). Det er resistent mot sure omgivelser og proteolyse, og ødelegges ikke av verken magesyre, proteolytiske tarmenzymer eller

oppvarming av kontaminert mat (Arnesen et al. 2008). Det vanligste kilden for emetiske *B. cereus*-stammer er kokt ris (Shinagawa 1990), som skyldes at *B. cereus* er til stede på risjordene. Det emetiske syndromet vil vanligvis inntreffe 1-5 timer etter inntak av kontaminert mat, men også dette er selvbegrensende og pasienten vil vanligvis komme seg igjen innen 24 timer (Bottone 2010). Sykdommen er vanligvis ukomplisert, men det er kjent minst ett tilfelle hvor cereulid fra emetiske *B. cereus*-stammer har ført til leversvikt og påfølgende død i en pasient (Mahler et al. 1997).

### **Genetisk forhold mellom patogene *B. cereus*-stammer**

Multilokus enzyelektroforese (MLEE<sup>3</sup>), MLST og sekvensering av 16s rDNA viser at stammer som forårsaker diare er genetisk svært heterogene (Ehling-Schulz et al. 2005), mens de emetiske stammene er en langt mer klonale (Agata et al. 1996, Carlin et al. 2006, Apetroaie et al. 2005). Det er antydnet at emetiske *B. cereus*-stammer ganske nylig har tilegnet seg cereulid-plasmidet, og derfor utviser de så lite genetisk variasjon, siden de ikke har hatt nok tid til å opparbeide seg genetisk variasjon (Ehling-Schulz et al. 2005). Generelt er det vist kliniske isolater av *B. cereus* har langt mindre genetiske variasjon enn tilsvarende isolater fra jord og matvarer (Helgason et al. 2000a).

### **1.2.2 *Bacillus thuringiensis***

*B. thuringiensis* er et insektpatogent medlem av *Bacillus cereus*-gruppen. Bakterien er oppkalt etter den tyske staten Thüringen, hvor en forsker oppdaget bakterien i døde middelhavs-møll (Ibrahim et al. 2010). Patogenisiteten mot insekter kommer av at bakterien produserer store krystallproteintoksiner under sporulering, som er artsspesifikt toksiske mot en rekke insektlarver (Bravo et al. 2007). Disse krystallene består hovedsakelig av et eller flere proteiner kalt «Crystal toxin» (Cry) eller Cytolysin (Cyt) (Bravo et al. 2007), og omtales ofte som  $\delta$ -endotoksiner (Ibrahim et al. 2010). *cry*-genene består av minst 50 undergrupper med totalt mere enn 200 medlemmer og ulike spesifisiteter mot insekter (Bravo et al. 2007), og er lokalisert på plasmider av ulike størrelser (Carlson et al. 1996). Krystallene akkumuleres i morcellen og danner en krystallinklusjon som kan stå for 20-30 % av tørrvekten til cellen

---

<sup>3</sup> En metode for å studere slektskap mellom bakteriearter/-stammer basert på elektroforetisk mobilitet bakterienes enzymer. Ulike aminosyresekvenser til et gen som koder for et enzym fører til ulik mobilitet når de kjøres på gelelektroforese. Slektskap mellom bakteriestammer kan dermed visualiseres fra en matris av parvise forskjeller mellom elektroforetiske typer.

(Schnepf et al. 1998). Krystallene fins i ulike former, inkludert bipyrimidale, kubiske, flate rektangulære, irregulære, sfæriske og rombiske, (Schnepf et al. 1998) og er så store at de kan observeres i mikroskop (Kim et al. 2004). Cry-toksinene er protoksiner, og når de inntas av insektlarver løser protoksinkrystallene seg i insektmagen og kløyves av insektkodete tarmproteaser og danner det aktive toksinet. Toksinet kan da binde seg til reseptorer på den apikale siden av epitelceller i insektarmen, og danner porer i cellemembranen som fører til at tarmen immobiliseres og at epitelcellene lyserer. Larven dør vanligvis av sepsis kort tid senere (Schnepf et al. 1998, Bravo et al. 2007). Cyt-toksinene interagerer direkte med membranlipider ved å sette seg inn i membranen og danne porer (Bravo et al. 2007). I tillegg til krystalltoksinene, som dannes under sporulering, uttrykker flere *B. thuringiensis*-stammer vegetative insekticidale proteiner (VIP), som også er toksiske for insektverten. VIP uttrykkes i det vegetative vekststadiet til organismen, i tillegg til under sporulering (Jensen et al. 2003), og det antas at VIP-genene også sitter på plasmider (Schnepf et al. 1998).

*B. thuringiensis* er en utbredt jordorganisme, men bakterien er òg blant annet isolert fra insekter, lagerstøv, løv (Schnepf et al. 1998) og kontaminert mat (McIntyre et al. 2008). Det er fortsatt uklart hva som utgjør den økologiske hovednisjen til *B. thuringiensis*, men blant annet insekter, bladoverflater og jord er foreslått (Schnepf et al. 1998).

### **Bruk av *B. thuringiensis* som biologisk insektmiddel**

På grunn av sin spesifikke insektdrepende aktivitet har *B. thuringiensis* blitt et viktig redskap i kampen mot skadedyr. Det første *B. thuringiensis*-baserte insektmidlet kom på markedet i Frankrike i 1938, mens ble ikke brukt kommersielt i USA før 1958 (Ibrahim et al. 2010). I dag er *B. thuringiensis*-holdige preparater de mest brukte biologiske insektmidlene på verdensbasis (Soberon et al. 2007). Det er i dag tre viktige bruksområder for slike insektmidler; kontroll av skadedyr i skogbruk, kontroll av mygg som er vektorer for humane sykdommer og i utvikling av transgene insektresistente planter (Bravo et al. 2007). Det førstnevnte bruksområdet er kanskje det mest suksessfulle, hvor bruk av *B. thuringiensis* har ført til en drastisk reduksjon i bruken av kjemiske insektmidler på barskog i Canada og USA (Bravo et al. 2007). Krystalltoksinene er svært aktive mot flere insektarter som er vektorer for sykdommer som denguefeber, elveblindhet og malaria, og bruk av *B. thuringiensis*-holdige insektmidler har ført til en drastisk reduksjon i flere av disse sykdommene i en rekke land i Vest-Afrika (Bravo et al. 2007). Det nyeste bruksområdet for *B. thuringiensis* i insektkontroll,



er i transgene avlinger. Da har man introdusert *cry*-gener i planter som tobakk, potet, bomull og mais, slik at plantene produserer sine egne krystalltoksiner, og dermed trenger langt mindre insektmiddel utenfra. Slik bruk er mindre skadelig for miljøet enn syntetiske insektmidler, og det påvirker vanligvis ikke insekter som er gunstige for plantene (Schnepf et al. 1998).

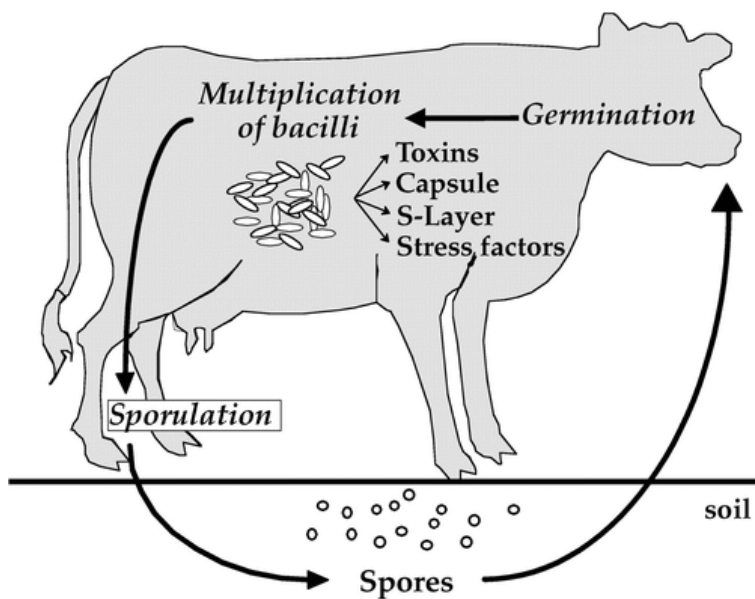
### **Tilfeller av *B. thuringiensis*-forårsaket sykdom**

Til tross for at *B. thuringiensis* anses som et insektpatogen, er det også registrert tilfeller hvor bakterien har vært involvert i humane infeksjoner. Organismen kan bære de samme kromosomalt kodete genene for enterotoksin, fosfolipaser, hemolysiner og proteaser som *B. cereus*, og har vært implisert i flere tilfeller av gastrointestinal sykdom (Scarano et al. 2009, McIntyre et al. 2008). Stammen *B. thuringiensis konkukian* serotype H34 ble isolert fra et tilfelle av alvorlig human vevsnekrose etter krigsskade som følge av landmine (Hernandez et al. 1998). Det er òg registrert et tilfelle hvor *B. thuringiensis* forårsaket dødelig bakteriemi som følge av en pulmonær infeksjon i en pasient med nedsatt immunstatus (Ghelardi et al. 2007). Flere ulike *B. thuringiensis*-stammer har vist seg å kunne gi dødelig infeksjon i forsøk på mus med nedsatt immunstatus, som befestet at *B. thuringiensis* er en opportunistisk patogen (Hernandez et al. 1999). Det er likevel vanskelig å vite med hvilken frekvens *B. thuringiensis* forårsaker sykdom i mennesker, siden medlemmer av *B. cereus*-gruppen som isoleres fra humane infeksjoner vanligvis ikke testes for tilstedeværelsen av krystalltoksingener. Det er òg tenkelig at *B. thuringiensis* mister plasmidene sidene under infeksjon i mennesker, siden disse plasmidene ofte er mindre stabile ved 37 °C enn ved lavere temperaturer. Alt dette gjør at *B. thuringiensis* som isoleres fra humane infeksjoner lett kan feilaktig tolkes å være *B. cereus*, da de med unntak av krystalltoksinplasmidene er svært like *B. cereus* (Økstad og Kolstø 2011).

### **1.2.3 *Bacillus anthracis***

*Bacillus anthracis* er den mest kjente patogene organismen i *B. cereus*-gruppen, da den forårsaker den dødelige sykdommen miltbrann i mennesker og dyr (Koehler 2009). Organismen fins over hele verden, med endemiske områder på alle kontinenter bortsett fra Antarktika (Pepper og Gentry 2002). I miljøet finner man *B. anthracis* hovedsakelig som svært motstandsdyktige sporer, og de kan trolig overleve i miljøet i denne formen i årtier –

muligens århundrer (Rasko et al. 2005). Genomiske studier av *B. anthracis* har vist at arten er genetisk ekstremt monomorf, og alle kjente isolater av arten kan bare skilles fra hverandre på et relativt lite antall enkelt nukleotidpolymorfismer (Keim et al. 1997, Keim et al. 2009), og så langt har alle sekvenserte isolater av *B. anthracis* vist seg å ha en kromosomal nukleotidsekvenslikhet på over 99 % (Read et al. 2002). *B. anthracis* er en av de mest monomorfe bakterieartene som er kjent (Mock og Fouet 2001). Det at arten er så klonal som den er antas å skyldes artens livssyklus, hvor den mesteparten av tiden befinner seg i et dormant spore stadium, helt til den finner veien inn i et pattedyr (Figur 2). Her kan arten germinere til vegetative celler, og i løpet av relativt kort tid ta livet av verten. Når verten er død kommer bakterien i kontakt med oksygen som fører til sporulering, hvor den forblir i sporeform frem til neste gang den kommer i kontakt med en vert. På denne måten tilbringer *B. anthracis* svært lite tid som vegetative celler, og har dermed lite tid til evolusjonsmessig endring og genetisk utveksling, som igjen fører til at arten forblir klonal (Mock og Fouet 2001). Det er påvist at *B. anthracis* er i stand til å vokse vegetativt i rizosfæren til planter, men det er ikke kjent i hvilken grad dette forekommer i naturen (Saile og Koehler 2006). Til tross for den homogene tilværelsen til *B. anthracis*, har fylogenetiske studier klart å dele organismen inn i tre ulike klader, A, B og C, med ulik geografisk fordeling (Keim et al. 2000). A-kladen inneholder størsteparten av de kjente isolatene, og er isolert fra store deler av verden. Stammer fra B-kladen fins hovedsakelig i Sør-Afrika og deler av Europa, og C-kladen består av noen få sjeldne isolater og er kun isolert i USA (Van Ert et al. 2007, Keim et al. 2009, Keim et al. 1999).



Figur 2.

*B. anthracis* sin livssyklus. *B. anthracis*-sporer i jorden inntas av pattedyr og germinerer inne i verten. De vegetative cellene multipliserer og uttrykker virulensfaktorer. Når verten er død sporulerer *B. anthracis*-cellene i kontakt med oksygen, og sporene kommer tilbake til jorda. Figuren er hentet fra Mock og Fouet, 2001.

## pXO1 og pXO2

Virulensegenskapene til *B. anthracis* stammer fra to virulensplasmider, kalt pXO1 og pXO2, og begge kreves for full virulens (Mock og Fouet 2001). Det antas i dag at *B. anthracis* oppstod som følge av at en enkelt *B. cereus*- eller *B. thuringiensis*-stamme en gang i fortiden tilegnet seg pXO1 og pXO2 (Koehler 2002).

pXO1 er et ca. 181kb stort plasmid som koder for miltbranntoksinet, som består av tre proteinkomponenter. Plasmidet har en patogenisitetsøy på 44,1 kb, som inneholder toksingenene *pagA*, *cya* og *lef*, som koder for henholdsvis beskyttende antigen (PA), ødemfaktor (EF) og letal faktor (LF). Patogenisitetsøyen inneholder også de regulatoriske genene *atxA* og *pagR* (Okinaka et al. 1999). Toksinbestanddelene går sammen i binære kombinasjoner av PA+EF eller PA+LF, og er av typen AB-toksin. I en vert vil PA binde seg spesifikt til celleoverflatereseptorer på vertsceller, og deretter kløyves vertsproteaser. Den proteolytiske aktiveringen av PA fører til frigiving av et 20 kDa-fragment (PA20) fra det resterende 63 kDa (PA63) store fragmentet, som blir sittende fastbundet til vertscellen. PA63 får da eksponert et bindingssete, som kan binde EF eller LF kompetitivt. Når PA63 har bundet EF eller LF internaliseres komplekset, og i det sure intracellulære endosomet vil LF/EF translokaliseres ut i cytosol. EF er en adenylat cyklase som konverterer intracellulær ATP til cAMP, og gir dermed en kraftig økning i intracellulært cAMP som fører til ødemdannelse, ved at cellens nivåer av kloridioner og vann drastisk reduseres. LF er en sinkmetalloprotease, som virker ved å kløyve aminoterminal ende til mitogen-aktiverede proteinkinaser, som gir celledøds og til slutt død for verten (Mock og Fouet 2001, Edwards et al. 2006). Alle de tre toksingenene er under positiv kontroll av regulatoren *atxA* (Uchida et al. 1993) og deleksjon av dette genet fører til drastisk redusert virulens i organismen (Dai et al. 1995). Regulatoren *PagR* er også underlagt kontroll av *AtxA*, og er selv en svak repressor av *pag*-operonet (Hoffmaster og Koehler 1997).

Plasmidet pXO2 er et ca. 96kb stort plasmid som koder for poly- $\gamma$ -D-glutaminsyre-kapselen til *B. anthracis*. Kapselgenene er lokalisert i operonet *capBCADE*, og er organisert i en patogenisitetsøy sammen med de positive kapselgenregulatorene *acpA* og *acpB* (Uchida et al. 1985). Kapselen er en lineær polymer av poly- $\gamma$ -D-glutaminsyre, og anses som den kanskje viktigste virulensfaktoren til *B. anthracis* (Hudson et al. 2008). Kapselen antas å virke ved å beskytte vegetative celler i en vert, slik at den unngår fagocytisk drap fra vertens makrofager og øker systemisk sepsis (Makino et al. 1989, Drysdale et al. 2005). Kapselgenoperonet er

under kontroll av regulatorenne *acpA* og *acpB*, som igjen er under kontroll av regulatoren AtxA fra pXO1-plasmidet, som viser at det er krysskommunikasjon mellom plasmidene (Guignot et al. 1997). Uttrykkningen av AtxA-regulatoren, og dermed miltbranntoksin og kapsel, er mest aktiv ved 37 °C og i nærvær av CO<sub>2</sub>, noe som ligner forholdene organismen finner i en pattedyrvert (Hoffmaster og Koehler 1997).

## **Miltbrann**

Miltbrann er en infeksjonssykdom som har vært kjent for menneskeheten i årtusener. Den kanskje første beskrivelsen av sykdommen finner man i bibelens 2. mosebok, som den femte landeplagen som rammet Egypt (Brachman 1970). Andre tidlige beskrivelser av miltbrann inkluderer den greske forfatteren Homers verk «Iliaden» (ca. 1190 f. Kr) (Schwartz 2009) og den romerske poeten Virgils læredikt om landbruk, *Georgica* (ca. 37-30 f. Kr) (Sternbach 2003). På 1600-tallet tok en pandemi kjent som «den sorte bane» livet av ca. 60 000 mennesker, og like mange dyr, i Europa (Brachman 1970), og på 1700-tallet tok en miltbrann-epidemi livet av omtrent halvparten av sauebestanden i Europa (Schwartz 2009).

Inhalasjonsmiltbrann ble kjent som «wool-sorters' disease» i Viktoriatidens England, da det ofte rammet folk som jobbet med dyreprodukter (Brachman 1970). På starten av 1900-tallet dukket det stadig opp humane tilfeller av inhalasjonsmiltbrann i den vestlige verden, hovedsakelig blant folk som jobbet med tekstiler og garving (Pepper og Gentry 2002). Siden den tid har insidensen sunket drastisk, men det dukker opp sporadiske tilfeller blant rusmisbrukere, og det er fortsatt endemiske tilfeller av miltbrann rundt om i verden, hovedsakelig hos dyr (Sternbach 2003).

## **Miltbrann som middel i biologisk krigføring og medisinsk utvikling**

På grunn av sin potensielle bruk i biologisk krigføring, har det blitt forsket på miltbrann i dette øyemed i lang tid. Under første verdenskrig ble miltbrann forsket på for bruk som våpen av deltakere på alle sider i konflikten (Schwartz 2009). Under 2. verdenskrig jobbet Japan med hemmelig program for utvikling av bakteriologisk krigføring, inkludert miltbrann, kolera og pest, og brukte levende mennesker som forsøksdyr (Schwartz 2009). Sovjetunionen hadde store forskningsprogrammer på biologisk krigføring, som ble avslørt av avhoppere tidlig på 1990-tallet. I 1979 oppstod det en ulykke ved en militær forskningsinstallasjon i Sverdlovsk i Sovjet, som forårsaket et utbrudd av miltbrann i området rundt. Det anslås at minst 100

personer døde som følge av utbruddet (Schwartz 2009), som var det største utbruddet av inhalasjonsmiltbrann i det 20. århundre (Jernigan et al. 2001).

I sammenheng med den synkende insidensen av inhalasjonsmiltbrann utover 1900-tallet konkluderte Center for Disease Control i USA i 1980 med at inhalasjonsmiltbrann nå «kun hadde historisk interesse» (Brachman 1980). Dette skulle vise seg å være feil. I oktober og november 2001 ble 11 tilfeller av bekreftet inhalasjonsmiltbrann og 11 bekreftede eller mistenkte tilfeller av kutan miltbrann rapportert i USA (Sternbach 2003), i det som i ettertid ble kalt «Amerithrax»-angrepet (Mair 2008). Under terrorangrepet ble minst fem konvolutter som inneholdt *B. anthracis*-sporer sendt via post til medieselskaper i Florida og New York og kongresskontor i Washington DC (Mair 2008). I alt fem personer døde som følge av miltbrann-brevene, alle av inhalasjonsmiltbrann (Schwartz 2009).

*B. anthracis* har også vært involvert i mange viktige medisinske fremskritt. I 1876 brukte Robert Koch bakterien til å utforme sine postulater angående overføring av infeksjøs sykdommer (Brachman 1970) og i 1881 brukte Louis Pasteur miltbrann-bakterier i sitt eksperiment hvor han inokulerte kyr med anthracis-organismer, med det som var den første vaksinen med levende attenuerte organismer (Sternbach 2003).

## **Smitte, sykdomsforløp og behandling**

Miltbrann er en zoonotisk sykdom som spesielt planteetende dyr er mottagelige for. Miltbrann-zoonoser i planteetere er vanligst etter perioder med stor nedbør, som etterfølger perioder med tørke, da dette fører til at *B. anthracis*-sporer konsentreres i lavereliggende områder (Beatty et al. 2003). Humane miltbrann-infeksjoner oppstår fra kontakt med kontaminerte dyr eller dyreprodukter, og det er ikke rapportert noen tilfeller av menneske-til-menneske-smitte (Dixon et al. 1999). På grunn av veterinærprogrammer og dyrevaksinasjon er sjansene for å smittes med miltbrann i industrialiserte land svært liten, selv for personer som er i jevnlig kontakt med gårdsdyr. Men miltbrann fortsetter å være et problem i flere deler av verden, inkludert Spania, Tyrkia, Albania, Hellas, Romania, Sentral-Asia og vestlige Afrika (Pepper og Gentry 2002). Miltbrann kommer i tre ulike former, som avhenger av smitteveien og gir ulike sykdomsbilder og prognoser; kutan form (via hud), inhalasjonsmiltbrann og gastrointestinal miltbrann (Mock og Fouet 2001). Uansett smittevei, så initieres infeksjonen ved at verten kommer i kontakt med *B. anthracis*-sporer. Sporene i seg selv er inerte, med så snart de er inne i verten kan de germinere til vegetative celler, og det

er den vegetative formen av organismen som produserer alle de kjente *B. anthracis*-virulensfaktorene. Når endosporer introduseres i kroppen blir de tatt opp av makrofager, og fraktet til regionale drenerende lymfeknuter. Sporene germinerer inne i makrofagene under transport, slipper ut, multipliserer i lymfesystemet, entrer blodstrømmen og forårsaker massiv septikemi (Dixon et al. 1999).

Kutan miltbrann utgjør den vanligste formen for sykdommen, men er også den mildeste. Omtrent 95 % av alle tilfellene av human miltbrann på verdensbasis er den kutane formen. Mest utsatt er personer som jobber med dyr eller dyreprodukter (Tutrone et al. 2002). De patogene endosporene introduseres subkutant via små kutt eller sår i huden eller gjennom hårfibre, men de kan òg introduseres via bitt fra insekter som har spist på et infisert kadaver (Dixon et al. 1999, Jensen et al. 2003). Ved kutan miltbrann får pasienten karakteristiske sorte eller brune sårskorper i huden (Dixon et al. 1999). Ubehandlet anslås dødeligheten til kutan miltbrann å være på omtrent 20 %, men ved antibiotikabehandling synker den til under 1 % (Beatty et al. 2003). Inhalasjonsmiltbrann er den mest dødelige formen av sykdommen, men star bare for nærmere 5 % av alle kjente humane tilfeller (Brachman 1970, Edwards et al. 2006). Infeksjonen initieres ved inhalering av partikler som bærer *B. anthracis*-sporer. Endosporene har en diameter på 1-2 µm, som gjør dem ideelle for deponering i lungealveolene (Dixon et al. 1999). Ubehandlet er dødeligheten ved inhalasjonsmiltbrann nærmere 100 %, og selv med antibiotikabehandling er dødeligheten rundt 40 % (Beatty et al. 2003). Den gastrointestinale formen for miltbrann oppstår ved spising av rått eller for dårlig stekt kjøtt som er infisert med *B. anthracis*-sporer (Mock og Fouet 2001). Denne miltbrannformen er svært sjelden i den industrialiserte verden, mye på grunn av effektiv beskyttelse av matvarer, som dyrevaksinering, veterinærinspeksjon av dyr før slakting og inspeksjon av dyrekadaver etter slakting (Beatty et al. 2003). Alvorligheten ved GI-miltbrann er mer varierende enn for de andre formene, med en dødelighet på 25-60 % ved ubehandlede tilfeller (Edwards et al. 2006), men med antibiotikabehandling er dødeligheten et sted under 40 % (Beatty et al. 2003).

Miltbrann er mulig å behandle med en rekke antibiotika, inkludert penicillin, streptomycin, tetracyklin, doxycylin, erytromycin og ciprofloxacin (Dixon et al. 1999). Uansett sykdomsform er effektiviteten av behandlingen svært avhengig av rask diagnostisering og oppstart av behandling. Idet infeksjonen er etablert blir derimot medisinsk intervensjon

vanskelig. Selv ved tidlig diagnostisering er prognosene for pasienter med inhalasjonsmiltbrann dårlige (Edwards et al. 2006).

## 1.3 PlcR

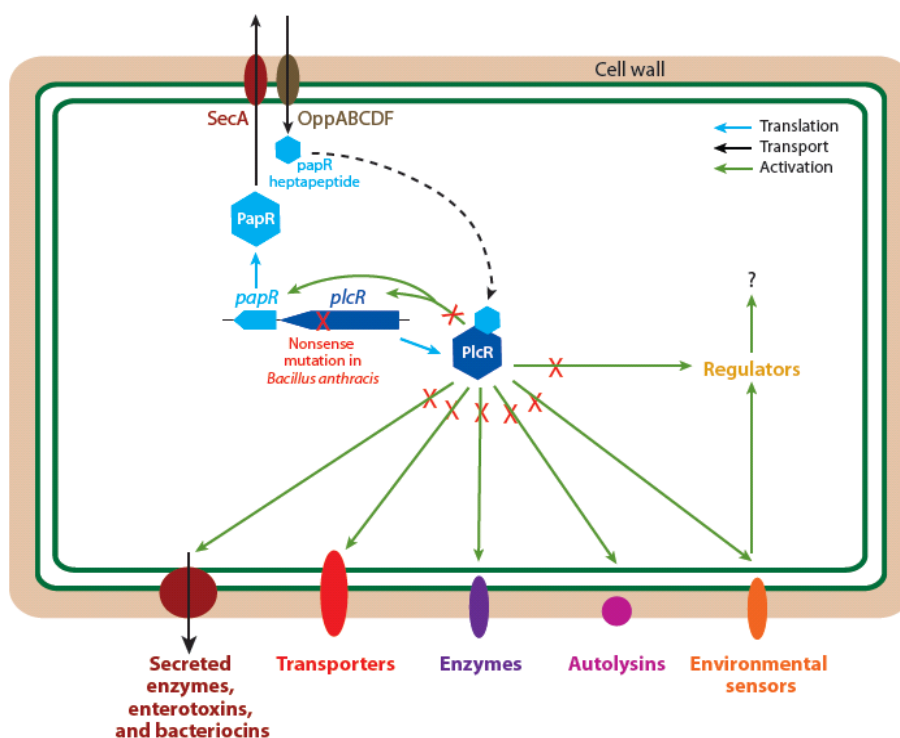
PlcR er en pleiotrop positiv transkripsjonsregulator som kodes for av genet *plcR*, som sitter på kromosomet til alle medlemmer i *B. cereus*-gruppen (Agaisse et al. 1999). PlcR oppregulerer en rekke ekstracellulære virulensfaktorer hos *B. cereus*-gruppeorganismene, inkludert kollagenase, fosfolipaser, hemolysiner, proteaser og enterotoksiner (Gohar et al. 2002, Slamti et al. 2004, Okstad et al. 1999), og har fått navnet fordi det først ble oppdaget at den regulerte transkripsjonen av fosfolipase C i *B. thuringiensis* («phospholipase C regulator») (Lereclus et al. 1996). PlcR regulerer også transkripsjonen av celleveggproteiner som er involvert i celleimmunitet, legemiddelefflukstransport, celleveggbiosyntese og miljømessig sansing, samt et lite antall cytoplasmiske proteiner, inkludert selve PlcR-proteinet (Figur 3) (Gohar et al. 2008). Det er òg mulig at PlcR er involvert i andre cellulære prosesser, som sporulering (Gohar et al. 2008) og biofilmdannelse (Hsueh et al. 2006). PlcR er viktig for patogenisitet blant medlemmene i *B. cereus*-gruppen, og både *B. cereus* og *B. thuringiensis* får sin virulens i musemodeller enten drastisk redusert eller fullstendig fjernet når *plcR*-genet inaktiveres (Salamitou et al. 2000). PlcR har vist seg å være viktig for *B. thuringiensis* sin evne til å være insektpatogen, og ved inaktivering av genet blir også denne egenskapen drastisk redusert (Salamitou et al. 2000). De kromosomalt kodete enterotoksinene Nhe, Hbl og CytK som er identifisert i *B. cereus*, og som organismen er avhengig av for å forårsake diare-syndrom i en human vert, er alle PlcR-regulerte (Arnesen et al. 2008, Brillard og Lereclus 2004), mens uttrykk av cereulid i emetiske stammer reguleres ikke av PlcR (Lucking et al. 2009). Tilstedeværelsen av *plcR* i alle artene i *B. cereus*-gruppen antyder at alle har potensiale til å være patogene (Hendriksen et al. 2006, Arnesen et al. 2008).

PlcR er avhengig av peptidet PapR («peptide activating PlcR») for å kunne utøve sin funksjon, og sammen inngår de i et «quorum sensing»-system<sup>4</sup> (Slamti og Lereclus 2002). PapR er et peptid som uttrykkes som et propeptid under kontroll av PlcR og eksporteres ut av cellen. Det prosesseres til sin aktive heptapeptidform enten under eksport ut av cellen eller ute i det ekstracellulære mediet, og fanges opp og fraktes inn i celler via

---

<sup>4</sup> «Quorum sensing» er et system bakterier bruker for å koordinere prosesser som virulens, sporulering, genoverføring og produksjon av antibiotika, gjennom en prosess som muliggjør koordinering av adferd for et helt samfunn mikroorganismer (Declerck et al. 2007)

oligopeptidpermeasesystemet OppABCDF (Slamti og Lereclus 2002, Gominet et al. 2001). PapR vil da binde seg til PlcR-proteinet og induserer en konformasjonsendring i PlcR (Slamti og Lereclus 2002). PlcR-PapR-komplekset vil deretter binde seg til spesifikke konserverte palindrome DNA-sekvenser som sitter oppstrøms for transkripsjonsinitieringsstedet for gener som er under kontroll av PlcR, kalt PlcR-bokser (Okstad et al. 1999) (Agaisse et al. 1999). Minst 28 aktive PlcR-bokser er identifisert på kromosomet til *B. cereus*, som regulerer i alt 45 gener (Gohar et al. 2008). PlcR-boksene er spredd over hele kromosomet, og ikke i en patogenisitetssøy (Gohar et al. 2008, Agaisse et al. 1999).



Figur 3.

PapR uttrykkes og fraktes ut av cellen. Deretter tas det opp igjen som aktivt heptapeptid, og binder seg til PlcR. PlcR-PapR-komplekset oppregulerer uttrykkningen av en rekke proteiner, inkludert ekstracellulære virulensfaktorer. De røde kryssene anmerker hvordan dette ikke forekommer i *B. anthracis*, på grunn av en nonsensmutasjon man finner i *plcR*-genet i alle *B. anthracis*-stammer. Figuren er hentet fra Kolstø et al. 2009.

Til tross for at *plcR* er til stede i alle artene i *B. cereus*-gruppen, er det ikke aktivt i *B. anthracis* på grunn av en karakteristisk nonsens-mutasjon i *B. anthracis* sitt *plcR*-gen som introduserer et prematurt stoppkodon som gir et trunkert, inaktivt polypeptid (Agaisse et al. 1999). Dette viser at *B. anthracis* ikke er avhengig av intakt *plcR* for å være virulent, da de viktige virulensfaktorene til *B. anthracis* sitter på plasmider og er ikke PlcR-regulerte (Kolsto et al. 2009). Siden mange av de PlcR-regulerte genene koder for sekreerte ekstracellulære



proteiner er det ekstracellulære proteomet til *B. anthracis* er svært begrenset i forhold til *B. cereus* og *B. thuringiensis* (Gohar et al. 2005).

## 1.4 *B. cereus*-stammer som forårsaker miltbrann-lignende sykdom

Til tross for at *B. cereus* anses som en generelt ufarlig bakterie, har det i nyere tid blitt rapportert tilfeller hvor *B. cereus* har forårsaket alvorlig miltbrann-lignende sykdom. Alle stammene som har blitt isolert fra disse tilfellene har hatt plasmider med likhet til *B. anthracis* sine virulensplasmider pXO1 og pXO2. Det er foreslått at slike høyvirulente *B. cereus*-stammer med *B. anthracis*-lignende plasmider bør klassifiseres som *B. cereus* var. *anthracis* (Kolsto et al. 2009). Det er òg foreslått at klassiske *B. anthracis*-stammer kalles *B. anthracis* sensu stricto, og *B. cereus*-stammene som forårsaker miltbrann-lignende sykdom kalles *B. cereus/B. anthracis* sensu lato så lenge fylogenetiske slektsforhold og fenotypiske karakteristika ikke er ordentlig kartlagt, slik at man unngår å feilaktig klassifisere dem som *B. anthracis* (Okinaka et al. 2006).

### 1.4.1 *B. cereus* CI og *B. cereus* CA

I 2001 og 2002 ble det oppdaget dødsfall blant seks sjimpanser i Tai nasjonalpark på Elfenbenskysten i Vest-Afrika (Leendertz et al. 2004), og i 2004 og 2005 ble det funnet tre døde sjimpanser og én død gorilla i en tropisk regnskog i Kamerun (Leendertz et al. 2006). Alle de døde apene så ut til å ha vært rammet av miltbrann basert på patologiske funn. PCR-screening av de Gram-positive, stavformede bakteriene som ble funnet vevsprøver fra apene viste også tilstedeværelse av *pag*- og *capC*-genene, som er assosiert med henholdsvis pXO1- og pXO2-plasmidene fra *B. anthracis* (Leendertz et al. 2004). Isolatene fra Elfenbenskysten og Kamerun ble navngitt henholdsvis *B. anthracis* CI og *B. anthracis* CA (Leendertz et al. 2006). Variable number tandem repeat (VNTR<sup>5</sup>) -analyser av bakterier som ble isolert fra vev- og beinprøver fra de døde apene avslørte at isolatene fra begge områdene var klart forskjellige fra tidligere beskrevne *B. anthracis*-stammer, og at CI- og CA-isolatene var identisk med hverandre (Leendertz et al. 2006). Nyere MLST-analyser har vist at CI/CA-stammene er fylogenetisk kartlagt å ligge i subgruppe I i *B. cereus*-gruppen (Figur 1), den

---

<sup>5</sup> VNTR er regioner i bakteriekromosomet som har et variabelt antall repetisjoner av en nukleotidsekvens etter hverandre.

samme gruppen som *B. anthracis* befinner seg i. Likevel er ikke CI/CA-stammene blant stammene som er nærmest beslektet til *B. anthracis* basert på kromosomale markører. Stammene skiller seg òg fra *B. anthracis* ved noen viktige fenotypiske trekk, som at de var motile, gammafag-resistente og at noen av isolatene var resistente mot penicillin G (Klee et al. 2010). Både CI- og CA-stammene hadde plasmider som var nært beslektet med *B. anthracis*-virulensplasmidene pXO1 og pXO2 (Klee et al. 2006a), og CI-stammen sine plasmider var over 99 % identisk med klassisk pXO1 og pXO2. De har dermed blitt kalt pCI-XO1 og pCI-XO2 (Klee et al. 2010). Sekvensering av flere deler av CI- og CA-genomet avslørte at stammene også hadde en leserammeskiftmutasjon i *plcR*-genet som sannsynligvis resulterer i et ikke-funksjonelt protein, men denne mutasjonen er plassert på et annet sted enn i *B. anthracis* (Klee et al. 2006a). Siden CI og CA viste seg å være isolater hvor begge virulensplasmidene til *B. anthracis* ble funnet i en *B. cereus*-typisk kromosomal bakgrunn, har stammene siden blitt omdøpt til *B. cereus* CI og *B. cereus* CA (Klee et al. 2010). Det er fortsatt uvisst hvordan CI og CA kan være så nært beslektet med hverandre i og med at de er isolert fra områder som er mer enn 1600 km fra hverandre. Det er mulig at det skyldes at de nylig har utviklet seg fra en motil stamfar, som ligner nært beslektede *B. cereus*- eller *B. thuringiensis*-stammer (Klee et al. 2010), eller at de er *B. cereus*-stammer som har tilegnet seg virulensplasmidene pXO1 og pXO2 (Økstad og Kolstø 2011).

#### **1.4.2 *B. cereus* G9241 og andre**

I 1994 ble en pasient innlagt på sykehus i Louisiana i USA med en alvorlig lungebetennelse som minnet om inhalasjonsmiltbrann forårsaket av stammen *B. cereus* G9241 (Hoffmaster et al. 2004). Isolatet hadde et plasmid som var 99,6 % identisk med plasmidet pXO1 i regionene som var delt mellom de to plasmidene, og kodet for alle tre bestanddeler fra miltbrann-toksin (PA, EF og LF), samt de regulatoriske proteinene AtxA og PagR. På grunn av sin likhet til pXO1 ble plasmidet kalt pBCXO1 (Hoffmaster et al. 2004). Man fant ingen plasmider som lignet pXO2, men det ble derimot identifisert et 218 kb stort plasmid kalt pBC218. Dette plasmidet kodet ikke for den pXO2-assosierte poly- $\gamma$ -D-glutaminsyre kapselen, men for en alternativ polysakkaridkapsel (Hoffmaster et al. 2004). Det ble senere også identifisert et operon kalt *hasACB* lokalisert på pBCXO1 som kodet for en hyaluronsyre kapsel (Oh et al. 2011). *B. cereus* G9241 uttrykker dermed to ulike kapselmaterialer; et ytre lag med hyaluronsyre, og et indre lag med polysakkarid. Museforsøk vist at stammen er avhengig av alle toksingene, samt begge kapselmateriale for full virulens (Oh et al. 2011). *hasACB*-

operonet er også identifisert på pXO1-plasmidet til *B. anthracis*, men der har det en rammeskiftmutasjon som gjør genet inaktivt (Oh et al. 2011). *B. cereus* G9241 viste seg å ha intakt *plcR*, og manglet andre klassiske fenotypiske *B. anthracis*-trekk, ved at stammen var hemolytisk, motil, gammafagresistent og penicillinresistent (Hoffmaster et al. 2004). MLST-studier av stammen var nært beslektet med, men fortsatt klart distinkt fra, klassisk *B. anthracis* (Hoffmaster et al. 2004). Stammen er plassert i subgruppe I i *B. cereus*-gruppefylogien, men er ikke blant stammene som er nærmest beslektet til *B. anthracis* basert på kromosomale markører (Figur 1). Til tross for at *B. cereus* G9241 representerer en høyvirulent utgave av *B. cereus*, har muse- og kaninforsøk vist at stammen var mindre virulent enn *B. anthracis* (Wilson et al. 2011).

I nyere tid har det blitt identifisert ytterligere tilfeller hvor høyvirulent *B. cereus* har forårsaket dødelig inhalasjonsmiltbrann-lignende sykdom i mennesker. Stammene *B. cereus* 03BB87, 03BB102 og Elc2 har alle blitt isolert fra slike tilfeller – alle sammen fra sveisearbeidere i Texas, USA (Avashia et al. 2007, Wright et al. 2011). To av tilfellene (03BB87 og 03BB102) oppstod omtrent samtidig, hos to som jobbet på samme arbeidsplass. Begge stammene hadde miltbrann-toksingenene *lef*, *pagA* og *cya*, og man fant i tillegg *B. anthracis*-kapselgenene *capA*, *capB* og *capC* i 03BB102 (Hoffmaster et al. 2006). Uttrykk av disse kapselgenene ble ikke observert i laboratoriet, men det er sannsynlig at de spiller en rolle i virulensen til bakterien (Hoffmaster et al. 2006). 03BB87 uttrykte derimot en polysakkaridkapsel som minnet om den til *B. cereus* G9241 (Hoffmaster et al. 2006). Amplifisert fragmentlengdepolymerasekjæde (AFLP<sup>6</sup>)-analyser viste at begge stammene var nært beslektet til *B. anthracis*, og plasserte seg nært andre kjente patogener medlemmer av *B. cereus*-gruppen. Ved både AFLP og MLST var det umulig å skille *B. cereus* 03BB87 fra *B. cereus* G9241, og det eneste som skilte de to fra hverandre var graden av uttrykk av kapsel (Hoffmaster et al. 2006). *B. cereus* Elc2 hadde også et pXO1-lignende plasmid som kodet for miltbrann-toksin, men manglet et pXO2-lignende plasmid (Wright et al. 2011). Stammen uttrykte kapsel, men det er fortsatt ukjent hva den består av. MLST av stammen viste at den var identisk med stammen *B. cereus* 03BB108, som ble isolert fra miljøet på arbeidsplassen til de to sveisearbeiderne som døde av 03BB87 og 03BB102, og som også er nært beslektet med *B. anthracis* (Wright et al. 2011). Alle de nevnte stammene (G9241, 03BB87, 03BB102 og Elc2)

---

<sup>6</sup> AFLP er en metode hvor det brukes restriksjonsenzymmer for å fordøye genomisk DNA, etterfulgt av ligering av dobbeltrådede DNA-adaptorer til endene av restriksjonsfragmentene. Fragmentene kan deretter amplifiseres ved PCR, og variasjoner i lengden på restriksjonsfragmentene mellom ulike bakteriearter-/stammer kan visualiseres via gelelektroforese.

stammer fra et relativt lite geografisk område i USA, hvor miltbrann er endemisk. Det er derfor foreslått at disse stammene kan ha tilegnet seg virulensplasmidene via horisontal genoverføring fra *B. anthracis* i miljøet (Hoffmaster et al. 2006).

## 1.5 Taksonomiske utfordringer i *B. cereus*-gruppen

Tidligere ble *B. anthracis*, *B. cereus*, og *B. thuringiensis* ansett som fundamentalt ulike arter, siden artene hadde svært forskjellige virulensegenskaper. Men disse grensene ble imidlertid utvasket da man etter hvert oppdaget at de nevnte virulensegenskapene skyldtes plasmidkodete gener. Det ble likevel hevdet at dette ikke utgjorde noe nevneverdig problem, siden man likevel kunne skille *B. anthracis* fra de to andre artene basert på klassiske fenotypiske og morfologiske trekk, som at *B. anthracis* er non-motil, følsom for penicillin G, non-hemolytisk, følsom for gammafag, vokser i lange kjeder på vanlig næringsmedium, bakteriecellene har firkantet tupp, og produserer store gråaktige kolonier med irregulær form og røff «knust glass»-aktig tekstur – mens *B. cereus* og *B. thuringiensis* er motile, resistente mot penicillin G, hemolytiske, ikke følsomme for gammafag, vokser hovedsakelig enkeltvis eller parvis på næringsmedium, bakteriecelle har mer avrundet tupp, og de produserer mindre, mer sirkulære kolonier som ofte er lysere i fargen (Turnbull et al. 1992, Koehler 2009, Davison et al. 2005). Disse fenotypiske trekkene er imidlertid ikke tilstrekkelig for å skille artene fra hverandre, da det er kjent at flere stammer av en gitt art ikke nødvendigvis faller inn under disse kriteriene (Jensen et al. 2003, Vilas-Boas et al. 2007).

Distinksjonen mellom artene ble ytterligere problematisert når molekylære tilnærminger ble brukt for å studere de tre artene. Sekvensering av 16S rDNA og 23S rDNA av en rekke stammer fra artene viste at de bare kunne skilles på et lite antall nukleotidsubstitusjoner, og variasjonen var i utgangspunktet ikke stor nok til å klassifisere dem som separate arter (Ash og Collins 1992, Ash et al. 1991). MLEE-, AFLP- og MLST-studier viste det samme, nemlig at de tre artene er meget nært beslektet, og at alle kjente *B. anthracis*-stammer er ekstremt monomorfe, mens *B. cereus*, og *B. thuringiensis* er sammenblandet i fylogenen og kan ikke skilles fra hverandre på noen konsekvent måte (Helgason et al. 2000b, Carlson et al. 1994, Hill et al. 2004, Jackson et al. 1999, Vilas-Boas et al. 2007). Det sistnevnte poenget har ført til det som kalles «*B. cereus* vs *B. thuringiensis*-problemet», nemlig at siden man ikke greier å skille de to artene på noen konsekvent måte, og *B. thuringiensis* i praksis er *B. cereus* som har tilegnet seg krystalltoksinplasmider, så er det hevdet at *B. thuringiensis* er en art som

eksisterer kun på papiret (Maughan og Van der Auwera 2011). Det er imidlertid identifisert et genotypisk kjennetegn som er særegent for *B. anthracis*, som er tilstedeværelsen av fire profager i *B. anthracis*-kromosomet, kalt Lambda01-04. Profager som ligner disse er identifisert i andre arter i *B. cereus*-gruppen, men man har så langt ikke identifisert noen stammer utenom *B. anthracis* som inneholder alle fire – mens alle kjente *B. anthracis*-isolater er funnet å ha alle fire profager i kromosomet. Profagene er tilsynelatende defekte, og ser ikke ut til å resultere i noen fagpartikler eller lysing av vertscellen (Sozhamman et al. 2006).

Det at man i dag bruker plasmidkodete egenskaper for å skille de tre artene fra hverandre, anses som et utilstrekkelig kriterium for artsdistinksjon, spesielt med tanke på at plasmider kan mistes og tilegnes. Dette blir spesielt problematisk når det etter hvert har dukket opp stammer av *B. cereus* som forårsaker miltbrann-lignende sykdom som skyldes at de har virulensplasmider med stor likhet plasmidene pXO1 og pXO2 – som blant annet er observert i stammene *B. cereus* CI og CA (se 1.4.1) (Klee et al. 2010). I tillegg finner man stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* som er nærmere beslektet med *B. anthracis* enn med stammer av sin egen art, uten at de nødvendigvis er patogener, samtidig som stammer som har pXO1- og pXO2-lignende plasmider kan ligge lengre unna *B. anthracis* basert på kromosomale markører enn stammer som ikke har disse elementene (Maughan og Van der Auwera 2011). Artsdefinisjonen i *B. cereus*-gruppen har likevel blitt beholdt grunnet sykdommene disse bakteriene forårsaker, samt den bioteknologiske nytteverdien av *B. thuringiensis*.

Til tross for diskusjonene om artsdefinisjonen i *B. cereus*-gruppen, er det klart at det i praksis er tre karakteristikk som skiller *B. anthracis* fra de øvrige medlemmene av *B. cereus*-gruppen, og alle er kromosomale faktorer: I) De er en del av den klonale clusteret som består av de svært monomorfe *B. anthracis*-stammene, etter analyse ved MLST, MLVA eller lignende metoder, II) de har den samme nonsens-mutasjonen i *plcR*-genet som man finner i alle kjente *B. anthracis*-stammer, og III) de har de fire kromosomale profagene Lambda01-04 (Kolsto et al. 2009).

## 1.6 Plasmider

Plasmid-innhold er svært vanlig blant organismene i *B. cereus*-gruppen. De står for de klassiske kjennetegnene som tradisjonelt har blitt brukt for å skille artene *B. cereus*, *B. thuringiensis* og *B. anthracis*. Ut over dette er det vanlig at en gitt *B. cereus*-gruppe stamme

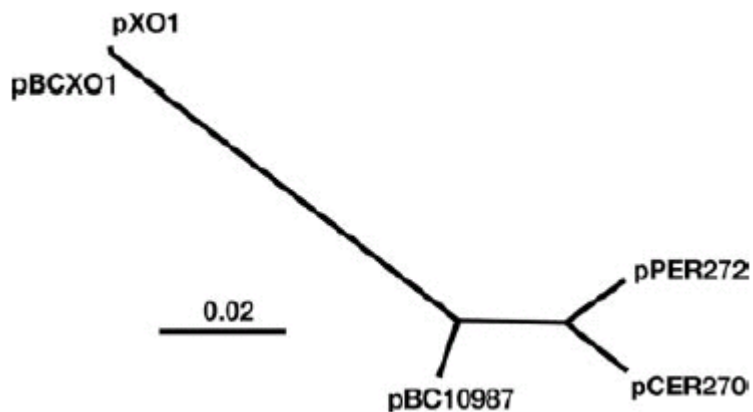
kan inneha opptil flere plasmider, som kan variere i størrelse mellom 5 kb og 600 kb, og mange av disse plasmidene har ukjent funksjon (Helgason et al. 2000a). *B. anthracis* derimot, har kun vist seg å ha plasmidene pXO1 og pXO2, uavhengig av hvor de er isolert fra (Bowen og Quinn 1999).

### 1.6.1 pXO1- og pXO2-lignende plasmider

Mange av plasmidene som er karakterisert blant artene i *B. cereus*-gruppen har vist seg å ha stor grad av sekvenslikhet med *B. anthracis* sine virulensplasmider pXO1 og pXO2. Disse plasmidene er ikke nødvendigvis assosiert med miltbrann-lignende sykdom, men flere av dem er implisert i ulike sykdommer. Felles for disse plasmidene er at de viser seg å dele flere konserverte kjerneregioner med *B. anthracis*-plasmidene – de har en såkalt konservert ryggrad de deler med pXO1 eller pXO2 (Pannucci et al. 2002a, Van der Auwera et al. 2005).

En rekke pXO1-lignende plasmider er nå kjent. Det 208 kb store plasmidet pBC10987 er isolert fra miljøisolatet *B. cereus* ATCC 10987 (isolert fra ost i Canada i 1930). Plasmidet mangler patogenisitetøyen med miltbranntoksingenene som man finner på pXO1, men inneholder i stedet gener som potensielt er involvert i tilpasning til en miljømessig eller patogen livsstil (Rasko et al. 2004). Genene som koder for cereulidproduksjon i emetiske *B. cereus*-stammer ligger på det 270 kb store plasmidet pCER270. Også dette plasmidet er beslektet med pXO1, men i dette tilfellet er patogenisitetøyen for miltbrann-toksinene fraværende, og erstattet med genclusteret *ces* som koder for cereulid (Ehling-Schulz et al. 2006). Det 272 kb store plasmidet pPER272 er isolert fra stammer av *B. cereus* som har vært involvert i humane tilfeller av periodontitt. Det er ukjent hvilken rolle dette plasmidet eventuelt spiller i sykdommen, men plasmidet er ofte funnet blant isolater fra slike tilfeller, som antyder en mulig sammenheng (Rasko et al. 2007). Plasmidet pBCX01 er isolert fra *B. cereus* G9241 (se 1.4.2), og inneholder et komplett sett med miltbranntoksingener (Hoffmaster et al. 2004). Figur 4 viser slektskapet mellom pXO1 og de pXO1-lignende plasmidene, og pBCX01 er nærmest beslektet med pXO1. Den konserverte ryggraden man finner blant alle plasmider som faller under pXO1-«paraplyen» inneholder en 50 kb stor region som inneholder gener som antas å være involvert i plasmidreplikasjon og vedlikehold. En 5 kb region i denne konserverte regionen inneholder et gen kalt *repX* som er nødvendig for plasmidreplikasjon og vedlikehold. *repX* er svært konservert mellom ulike pXO1-lignende plasmider, med en sekvenslikhet på over 98 %. Alle kjente pXO1-plasmider fra *B. anthracis*

har identisk *repX*. pXO1-lignende plasmider har også et gen kalt pXO1-58, som viser seg å være svært konservert mellom de ulike plasmidene, og antas å kode for et hypotetisk protein (Rasko et al. 2007). pXO1-lignende plasmider antas å ha utviklet seg sammen med kromosomet til vertsorganismen, for å forbedre bakteriens patogenese og/eller nisjetilpasning (Rasko et al. 2007).



Figur 4.

Fylogenetiske slektskapet mellom ulike pXO1-lignende plasmider og pXO1. Figuren er hentet fra Rasko et al. 2007.

Plasmidene pAW36 og pBT9727 er isolert fra henholdsvis *B. thuringiensis* kurstaki HD73, som brukes i insektmidler, og *B. thuringiensis* konkukian 97-27, som er isolert fra et tilfelle av alvorlig human vevsnekrose (Van der Auwera et al. 2008). Begge plasmidene har sekvenslikhet til pXO2, men mangler den ca. 25 kb store patogenisitetsoyene hvor kapselgenene er lokalisert (Pannucci et al. 2002b, Van der Auwera et al. 2005, Van der Auwera og Mahillon 2008). Begge plasmidene er konjugative, og er i stand til å overføre både seg selv, samt å mobilisere andre plasmider til andre bakterier (Van der Auwera et al. 2007, Van der Auwera et al. 2008). Et annet pXO2-lignende plasmid, pAJ1-1, ble isolert fra stammen *B. thuringiensis* var. Monterrey 4AJ1. Dette plasmidet inneholdt alle genene som er involvert i uttrykking av poly-D- $\gamma$ -glutamatkapsel, og stammen uttrykte en kapsel som ligner *B. anthracis*-kapselen (Cachat et al. 2008). Den konservative ryggrad blant disse pXO2-lignende plasmidene inneholder også i dette tilfellet et gen som er involvert i replikasjonsprosessen, kalt *repA* (Tinsley et al. 2004). Andre konservative deler av plasmidene korresponderer med antatte overføringsmoduler – en 42 kb stor region som inneholder alle de genetiske determinantene som antas å være direkte involvert i konjugasjon. pXO2 har punktmutasjoner i minst to komponenter som antas å spille en kritisk rolle i den konjugative prosessen, som fører til at disse overføringsprosessene er avskaffet i pXO2 (Van der Auwera et al. 2005). Dette kan tyde på at den pXO2-lignende gruppen med plasmider stammer fra en felles konjugativ stamfar (Van der Auwera et al. 2008).

## 1.7 Målet med studien

Utgangspunktet for studien var 147 ulike isolater av *B. cereus*-gruppen, isolert fra Etosha National Park (Namibia) nær sebra-kadavre som var døde av miltbrann. Målet med studien var å karakterisere disse isolatene for fenotypiske og genotypiske likhetstrekk til *B. anthracis*, for å, om mulig, identifisere nye *B. anthracis*-lignende varianter av *B. cereus*-gruppen. Siden grensene mellom *B. anthracis*, *B. cereus* og *B. thuringiensis* blir stadig mer uklare, vil det være interessant å undersøke om isolater fra *B. cereus*-gruppen som ikke er *B. anthracis*, men som er isolert fra et område hvor *B. anthracis* er endemisk, kan ha tilegnet seg likhetstrekk til denne organismen.

### 1.7.1 Preseleksjon av isolater til studien

Prøvene var isolert fra ulike områder på/ved kadavrene, og er isolert fra biologisk materiale og jord i henhold til WHO's Manual for Laboratory Diagnosis of Anthrax (WHO 2003). Isolatene har blitt preselektert for å forhindre at *B. anthracis*-stammer har blitt en del av studien, ved at bakteriene er kultivert på det kromogene næringsmediet Bacara – et medium som effektivt skiller *B. cereus*/*B. thuringiensis* fra *B. anthracis* på bakgrunn av *B. anthracis* sin manglende lecithinase-aktivitet (Tallent et al. 2012). Bakteriekulturer fra Bacara-medium har deretter blitt renkultivert på blodagar, som samtidig har gitt svar på om hvorvidt stammene er hemolytiske.



## 2 Material og metoder

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterieisolater

Tabell 1: Bakterieisolater som ble brukt i denne studien. Resultatene fra hemolysetesten<sup>7</sup> for FFIBCgr86-147 er ikke tilgjengelige.

Isolat	Prøvelokasjon	Hemolyse	Stamme	Prøvelokasjon	Hemolyse
FFIBCgr1	24	hemolytisk	FFIBCgr37	13	hemolyse
FFIBCgr2	24	hemolytisk	FFIBCgr38	11	hemolyse
FFIBCgr3	24	hemolytisk	FFIBCgr39	11	hemolyse
FFIBCgr4	24	hemolytisk	FFIBCgr40	11	hemolyse
FFIBCgr5	23	hemolytisk	FFIBCgr41	14	hemolyse
FFIBCgr6	22	hemolytisk	FFIBCgr42	3	Hemolytisk, kun 3 store kolonier
FFIBCgr7	22	hemolytisk	FFIBCgr43	3	Hemolytisk
FFIBCgr8	22	hemolytisk	FFIBCgr44	3	Hemolytisk
FFIBCgr9	22	hemolytisk	FFIBCgr45	3	Hemolytisk
FFIBCgr10	12	hemolytisk	FFIBCgr46	19C	Hemolytisk
FFIBCgr11	12	hemolytisk	FFIBCgr47	4	hemolytisk
FFIBCgr12	12	hemolytisk	FFIBCgr48	4	hemolytisk
FFIBCgr13	12	hemolytisk	FFIBCgr49	4	hemolytisk
FFIBCgr14	12	hemolytisk	FFIBCgr50	4	hemolytisk
FFIBCgr15	10	hemolytisk	FFIBCgr51	4	hemolytisk
FFIBCgr16	10	hemolytisk	FFIBCgr52	3	Svak hemolytisk
FFIBCgr17	10	hemolytisk	FFIBCgr53	3	Hemolytisk
FFIBCgr18	10	hemolytisk	FFIBCgr54	3	Ikke hemolytisk
FFIBCgr19	10	hemolytisk	FFIBCgr55	3	Ikke hemolytisk
FFIBCgr20	10	hemolytisk	FFIBCgr56	3	Hemolytisk
FFIBCgr21	10	hemolytisk	FFIBCgr57	3	Ikke hemolytisk
FFIBCgr22	10	hemolytisk	FFIBCgr58	3	Hemolytisk
FFIBCgr23	10	hemolytisk	FFIBCgr59	3	Ikke hemolytisk
FFIBCgr24	10	hemolytisk	FFIBCgr60	3	Hemolytisk
FFIBCgr25	10	hemolytisk	FFIBCgr61	3	Hemolytisk
FFIBCgr26	10	hemolytisk	FFIBCgr62	5	Hemolytisk
FFIBCgr27	10	hemolytisk	FFIBCgr63	5	Ikke hemolytisk
FFIBCgr28	21	hemolyse	FFIBCgr64	5	Ikke hemolytisk
FFIBCgr29	21	hemolyse	FFIBCgr65	5	Hemolytisk
FFIBCgr30	21	hemolyse	FFIBCgr66	5	Hemolytisk
FFIBCgr31	21	hemolyse	FFIBCgr67	19C	Ikke hemolytisk
FFIBCgr32	21	hemolyse	FFIBCgr68	19C	Ikke hemolytisk
FFIBCgr33	13	hemolyse	FFIBCgr69	19C	Ikke hemolytisk
FFIBCgr34	14	hemolyse	FFIBCgr70	19C	Ikke hemolytisk
FFIBCgr35	14	hemolyse	FFIBCgr71	19C	Ikke hemolytisk
FFIBCgr36	13	svak hemolyse	FFIBCgr72	19C	Ikke hemolytisk

<sup>7</sup> Hemolysetest ble gjort i P3-fasilitet før det praktiske arbeidet med denne oppgaven ble startet

FFIBCgr73	19C	Ikke hemolytisk	FFIBCgr111	5	-
FFIBCgr74	19C	Ikke hemolytisk	FFIBCgr112	10	-
FFIBCgr75	19C	Ikke hemolytisk	FFIBCgr113	10	-
FFIBCgr76	4	hemolytisk	FFIBCgr114	10	-
FFIBCgr77	4	hemolytisk	FFIBCgr115	10	-
FFIBCgr78	4	hemolytisk	FFIBCgr116	10	-
FFIBCgr79	4	hemolytisk	FFIBCgr117	10	-
FFIBCgr80	4	Ikke hemolytisk	FFIBCgr118	10	-
FFIBCgr81	4	Ikke hemolytisk	FFIBCgr119	10	-
FFIBCgr82	3	hemolytisk	FFIBCgr120	10	-
FFIBCgr83	3	hemolytisk	FFIBCgr121	10	-
FFIBCgr84	3	hemolytisk	FFIBCgr122	11	-
FFIBCgr85	3	Hemolytisk	FFIBCgr123	11	-
FFIBCgr86	4	-	FFIBCgr124	11	-
FFIBCgr87	4	-	FFIBCgr125	11	-
FFIBCgr88	4	-	FFIBCgr126	11	-
FFIBCgr89	4	-	FFIBCgr127	11	-
FFIBCgr90	4	-	FFIBCgr128	11	-
FFIBCgr91	4	-	FFIBCgr129	13	-
FFIBCgr92	4	-	FFIBCgr130	13	-
FFIBCgr93	4	-	FFIBCgr131	13	-
FFIBCgr94	4	-	FFIBCgr132	13	-
FFIBCgr95	4	-	FFIBCgr133	13	-
FFIBCgr96	4	-	FFIBCgr134	13	-
FFIBCgr97	4	-	FFIBCgr135	13	-
FFIBCgr98	4	-	FFIBCgr136	13	-
FFIBCgr99	4	-	FFIBCgr137	13	-
FFIBCgr100	4	-	FFIBCgr138	3	-
FFIBCgr101	5	-	FFIBCgr139	3	-
FFIBCgr102	5	-	FFIBCgr140	3	-
FFIBCgr103	5	-	FFIBCgr141	3	-
FFIBCgr104	5	-	FFIBCgr142	3	-
FFIBCgr105	5	-	FFIBCgr143	3	-
FFIBCgr106	5	-	FFIBCgr144	3	-
FFIBCgr107	5	-	FFIBCgr145	5	-
FFIBCgr108	5	-	FFIBCgr146	19B	-
FFIBCgr109	5	-	FFIBCgr147	17	-
FFIBCgr110	5	-			

#### Prøvelokasjon

- 3 Jordkjerne<sup>8</sup> fra innvollsement
- 4 Jordkjerne fra innvollsement
- 5 Jordkjerne nært kadaversted
- 10 Næringsjord
- 11 10 cm dyp jord, 5 meter unna kadaversted
- 12 Næringsjord under væske fra sebra
- 13 Kontrolljord utenfor kadaverstedet

#### Prøvelokasjon

- 14 Overflateleire 30 meter unna kadaversted
- 17 Jord
- 21 Jord
- 22 Jordoverflate under innvoller
- 23 Jordoverflate
- 24 Jordoverflate
- 19B Jord, 5 cm unna kadaversted
- 19C Jord, 10 cm unna kadaversted

<sup>8</sup> En sylindrisk seksjon med jord.

## 2.1.2 Primere

Tabell 2: Primere som ble brukt til å screene isolatene for pXO1- og pXO2-lignende plasmider, og til amplifisering og sekvensering av *plcR*.

Primer	Sekvens	Forventet fragmentstørrelse	Kilde
<b>pXO1- og pXO2-lignende plasmider</b>			
repX	GAAAGCCAAGGAAATATTAGTTTGAA AGCACTGGATTTTCCTCTTCA	573 bp	Bahl og Rosenberg, 2010
repA	MAACAAACAAARGCAGGGCG TTAACCAGCTGGYAGCCCTTC	693 bp	Bahl og Rosenberg, 2010
pXO1-58	GGTCTTAGCCATGAGAGTAAAAACA TGTGATGGACCTTTGTATTAATTGT	582 bp	Rasko et al, 2007
<b><i>plcR</i>-amplifisering og -sekvensering</b>			
<i>plcR</i> -4	GGTGAGTAAGTATGCACGCA AATGGCCATTTTCAGCRTAAA	522 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -7	TCAGCAGTTTCTTCAATGGCA TCATATTCCATCACCCRCATT	619 bp	Denne studien

## 2.1.3 Reagenser

Reagens	Produsent
Borsyre	Merck
Bromphenolblått	Bio-Rad
EDTA (dinatriumsalt)	Calbiochem
Etanol 96 %	Arcus
Etidiumbromid, 5 mg/mL	Sigma
Formalin 37 %	Merck
Gjærekstrakt	Oxoid
Glycerol 85 %	Merck
Kloramfenikol, 25 mg/mL	Sigma
Low Meltingpoint Agarose	Lonza
Natriumklorid (NaCl)	Merck
Natriumlaurylsarcosin (SDS)	Sigma
PBS	Sigma
RNAse fritt vann	Invitrogen
Saltsyre (HCl)	Prolab
Seakem LE Agarose	Lonza
SYBR Safe	Invitrogen
Tris Base [tris(hydroksymetyl)aminometan]	Sigma
Trypton	Oxoid
TSA	Merck
TSB	Merck
Xylene Cyanol	Sigma

## 2.1.4 Enzymer

<b>Enzym</b>	<b>Produsent</b>
LightCycler 480 Probesmaster	Roche
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche
Lysozym	Sigma
Proteinase K, 20 mg/mL	Roche

## 2.1.5 Størrelsesmarkører

	<b>Produsent</b>
1kb plus DNA Ladder	Invitrogen
Lamdaladder	NEB

## 2.1.6 Kit

	<b>Produsent</b>
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN

## 2.1.7 Annet

	<b>Produsent</b>
Penicillin G Susceptibility Discs, 10 units	Oxoid

# 2.2 Løsninger og vekstmedier

## 2.2.1 Løsninger

### 0,5M EDTA

18,61 g EDTA

Løses i 100 ml MQ-vann. pH justeres til 8,0. Autoklaveres og oppbevares ved romtemperatur.

### **1M Tris-HCl**

24,22 g Tris

6,5 ml HCl

pH justeres til 7,5, og volum justeres til 200 ml. Autoklaveres og oppbevares ved romtemperatur.

### **5M NaCl**

14,1 g NaCl

MQ-vann tilsettes til 0,5 L. Autoklaveres og oppbevares ved romtemperatur.

### **ESP-løsning**

19 mL 0,5M EDTA

0,2 g Natriumlaurylsarcosin

1 mL Proteinase K, 20 mg/mL

Natriumlaurylsarcosin løses i EDTA og ristes kraftig for å løse stoffet. Proteinase K tilsettes, og løsningen inkuberes ved 37 °C i 2 timer. Fryses ned, og tines opp ved behov.

### **Løsning 3**

1,6 g lysozym

0,8 mL 0,5M EDTA

1 mL 1M Tris-HCl, pH 7,5

38,2 mL MQ-vann

Alt blandes og løses og oppbevares ved romtemperatur.

### **PIV**

25 mL 1M Tris-HCl, pH 7,5

100 mL 5M NaCl

375 mL MQ-vann

Alt blandes og oppbevares ved romtemperatur.

### **1X TBE**

54 g Tris Base [tris(hydroksymetyl)aminometan]

22,5 g Borsyre

3,75 g EDTA dinatriumsalt

Deionisert vann tilsettes til 1 L. 200 mL av løsningen tilsettes 800 mL vann. Oppbevares ved romtemperatur.

### **1X Loading Buffer**

0,25 mL Xylene Cyanol FF

1,25 mL Bromphenolblått

3,45 mL 87 % glycerol

0,05 mL MQ-vann

Bestanddelene blandes, og tilsettes 45 mL 1X TBE.

### **1 % Agarosegel**

1,5 g Seakem LE Agarose

150 mL 1x TBE

10 µL SYBR Safe

Agarosen ble suspendert i TBE, og varmet i mikrobølgeovn til det var fullstendig oppløst. Løsningen ble nedkjølt til ca. 65 °C og tilsatt SYBR Safe.

### **Modifisert 10X TBE**

121,1 g Tris Base [tris(hydroksymetyl)aminometan]

61,8 g Borsyre

0,74 g EDTA

Destillert vann tilsettes til 1 L. Oppbevares ved romtemperatur.

### **0,25X Modifisert TBE**

2,5 mL 10X Modifisert TBE

97,5 mL Destillert vann

Bestanddelene blandes. Oppbevares ved romtemperatur.

### **2,6 % Low Melting Point Agarose**

260 mg Low Melting Point Agarose

10 mL PIV-løsning

Low Melting Point-agarosen løses i PIV i mikrobølgeovn. Løsningen holdes flytende på varmt vannbad med 42 °C til den skal brukes.

### **1 % Low Melting Point Agarose**

1 g Low Melting Point Agarose

100 mL 0,25x Modifisert TBE

Low Melting Point-agarose tilsettes 0,25x modifisert TBE, og varmes i mikrobølgeovn på svak intensitet til agarosen er fullstendig oppløst. Etidiumbromid tilsettes.

## **2.2.2 Vekstmedier**

### **TSA-medium**

40 g TSA

Løses i 1 L MQ-vann. Autoklaveres. Kjøles ned til ca. 60 °C og fordeles på agarplater.

### **TSB-medium**

30 g TSB

Løses i 1 L MQ-vann. Autoklaveres.

### **LB-medium**

10 g Trypton

5 g Gjærekstrakt

10 g NaCl

Løses i 950 mL destillert vann. pH justeres til 7,0 med HCl, og volumet justeres til 1L med destillert vann. Autoklaveres og lagres ved 4 °C.



## 2.3 Metoder

### 2.3.1 Analyse av koloni- og cellemorfologi

Nedfryste vegetative celler (-72 °C) ble sådd ut til enkeltkolonier på TSA-plater med sterile engangspodenåler, og inkubert overnatt ved 30 °C. Dagen etter ble koloniene karakterisert på bakgrunn av koloniform, elevasjon, kant, farge, tekstur og kolonistørrelse. Cellemorfologi ble bestemt ved hjelp av lysmikroskopi, og antall celler som vokste sammen, cellenes morfologi, lengde og om hvorvidt de dannet kjeder ble notert. Cellene ble fotografert med et fotoapparat koblet til lysmikroskopet (Zeiss). Celler fra TSA-platene ble videre igjen inkubert overnatt ved 30 °C for å stimulere sporulering. Sporulerende celler ble deretter karakterisert på bakgrunn av sporelokasjon i cellen, eventuelt oppsvulmet sporangium og tilstedeværelse av krystalltoksininkludjoner, som indikerer tilstedeværelse av *B. thuringiensis*.

### 2.3.2 Motilitetstest

Motilitetstest ble utført i henhold til Luna et al. 2005. Celler fra overnattskulturer ble overført med steril engangspodenål til 4 mL TSB i 50 mL koniske rør, og inkubert ved 30 °C i 2-3 timer (tidlig logaritmisk vekstfase) ved 125rpm. 2 µL av kulturen ble overført til et objektglass og inspisert i lysmikroskop for å bestemme motilitet. Stammer med tydelig bevegelse ble karakterisert som motile.

### 2.3.3 Penicillinfølsomhetstest

En steril engangspodenål med overnattskulturer av bakteriestammene ble overført til 200 µL TSB og blandet godt. 100 µL bakteriesuspensjon ble spredt over en TSA-plate med steril engangspatespreder. En penicillindisk (Penicillin G susceptibility Disc) 10 enheter penicillin G ble forsiktig plassert midt på TSA-platen. Prøvene ble inkubert ved 30 °C over natt. Etter 24 timer ble prøvene undersøkt for tilstedeværelse av sone med hemmet vekst rundt penicillindisken. Betalaktamasenegative isolater vil ha hemningszone rundt penicillindisken, mens betalaktamaseproduserende isolater vil ikke gi veksthemning.

### 2.3.4 DNA-ekstraksjon

Total-DNA (kromosomalt DNA og plasmider) fra bakterieisolatene ble ekstrahert ved hjelp av QIAamp DNA Mini-kit, i henhold til QIAamp DNA Mini Handbook med noen modifikasjoner. Bakterier fra overnatt kulturer ble overført med steril engangspodenål til 100  $\mu\text{L}$  PBS. Suspensjonen ble blandet godt og tilsatt ytterligere 900  $\mu\text{L}$  PBS. 370  $\mu\text{L}$  37 % formalin ble tilsatt suspensjonen for å inaktivere bakteriene, og blandet godt. Suspensjonen ble satt i kjøleskap over natt. Etter et døgn i kjøleskap ble bakteriesuspensjonen spunnet ned ved 7 000 g i 3 minutter, og supernatanten varsomt fjernet. Bakteriene ble deretter vasket med 1 mL PBS 2 ganger. Etter siste vask ble supernatanten fjernet, og 180  $\mu\text{L}$  lysozymløsning tilsatt for å lysere bakteriene. Suspensjonen ble deretter inkubert ved 37 °C i 30 minutter, hvorpå 20  $\mu\text{L}$  proteinase K og 200  $\mu\text{L}$  Buffer AL ble tilsatt suspensjonen for å fjerne proteiner. Suspensjonen ble vortekset raskt, og inkubert i 30 minutter ved 56 °C, og deretter i ytterligere 15 minutter ved 95 °C for å inaktivere proteinase K.

Etter inkubasjonstiden ble 200  $\mu\text{L}$  96 % etanol tilsatt prøven, og blandet ved pulsvorteksing i 15 sekunder. Etter blanding ble prøvene raskt sentrifugert for å fjerne alle dråper fra innsiden av lokket på eppendorfrørene. Alt innholdet i prøvene ble deretter overført til QIAamp Mini spin-kolonne i 2 mL samlerør. Kolonnen ble sentrifugert ved 8 000 rpm i 1 minutt, og ble deretter satt i nye 2 mL samlerør. De ble deretter tilsatt 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW1 og sentrifugert enda en gang ved 8 000 rpm i 1 minutt. Kolonnen ble på nytt satt i nye 2 mL samlerør og så tilsatt 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW2 og sentrifugert ved 14 000 rpm i 3 minutter. Kolonnen ble så plassert i rene 1,5 mL eppendorfrør, tilsatt 150  $\mu\text{L}$  Buffer AE, og inkubert ved romtemperatur i 1-3 minutter. Kolonnene ble så spunnet ved 8 000 rpm i 1 minutt for å eluere ut DNA. Eppendorfrørene med DNA fra bakteriestammene ble fryst ned ved -24 °C, og tint opp ved behov.

### 2.3.5 PCR-screening

Bakteriestammene ble screenet for tilstedeværelse av pXO1- og pXO2-lignende plasmider ved hjelp av Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki et al. 1985). PCR er en metode for å amplifisere en gitt DNA-sekvens mange størrelsesordener, og genererer millioner til milliarder av kopier av den ønskede sekvensen. For å utføre reaksjonen behøver man primer-sekvenser som er designet for å amplifisere den ønskede DNA-sekvensen, samt en blanding av enzymer, inkludert DNA-polymerase, som foretar syntesen gjennom

inkludering av enkelt nukleotidene til den voksende nysyntetiserte sekvensen. Under PCR-reaksjonen går prøvene gjennom ulike temperatursykluser, som er tilpasset henholdsvis denaturering av dobbeltrådet DNA, annealing (festing) av primerne til den ønskede DNA-sekvensen, og ekstensjon, hvor DNA-polymerase kopierer opp DNA-sekvensen. Ved Real Time PCR er reaksjonsblandingen tilsatt en substans (SYBR Green) som binder seg til dobbeltrådet DNA og fluorescerer, slik at det produserer et signal som kan måles kvantitativt for hver temperatursyklus under PCR-reaksjonen. På denne måten kan Real Time PCR-maskinen måle om det oppstår en økning i fluorescens etter hvert som reaksjonen går, og på denne måten påvise om den ønskede gensekvensen er tilstede i DNA-templatet som brukes i reaksjonen.

For å screene bakteriestammene for tilstedeværelse av pXO1- og pXO2-lignende plasmider ble primerparene repX-, pXO1-58 og repA benyttet (tabell 2). De to førstnevnte parene amplifiserer henholdsvis replikasjonsgenet *repX* og genet for det hypotetiske proteinet pXO1-58, som begge er lokalisert i den konserverte ryggradsregionen på pXO1-lignende plasmider (Bahl og Rosenberg 2010, Rasko et al. 2007). Begge vil vise tilstedeværelsen av pXO1-lignende plasmider, og skal i utgangspunktet resultere i positiv utslag hvis en bakteriestamme har pXO1-lignende plasmider. Primerparet repA amplifiserer replikasjonsgenet *repA*, som er en del av den konserverte ryggraden til pXO2-lignende plasmider. Primerne som detekterer pXO1-lignende plasmider vil amplifisere gener fra alle plasmider med de nevnte genene, inkludert, pBCX01, pPER272, pBC10987 og pCER270 (Bahl og Rosenberg 2010, Rasko et al. 2007). Primeren repA vil amplifisere replikonet til alle kjente pXO2-lignende plasmider, inkludert pAW63 og pBT9727 (Bahl og Rosenberg 2010).

En arbeidsløsning av hvert primersett ble laget, bestående av 5  $\mu$ M av hver primer i RNAsefritt vann. Følgende reaksjonsblanding ble brukt i Real Time PCR-screeningen:

---

PCR-reaksjonsblanding (20  $\mu$ L):

10  $\mu$ L LightCycler 480 SYBR Green I Master

4  $\mu$ L arbeidsløsning med primere

4  $\mu$ L RNAsefritt vann

2  $\mu$ L DNA-templat (isolert som i 2.3.4)

---

Reaksjonen ble utført med Lightcycler 480 (Roche) med følgende betingelser: Denaturering i 5 minutter ved 95 °C. Deretter 40 sykluser med denaturering ved 98 °C i 10 sekunder, annealing ved 60 °C i 30 sekunder og ekstensjon ved 72 °C i 40 sekunder. DNA fra stammen *B. anthracis* A31, som har både pXO1- og pXO2-plasmidene, ble brukt som positiv kontroll. Typestammen *B. cereus* ATCC 14579, som ikke har pXO1- eller pXO2-lignende plasmider, ble brukt som negativ kontroll.

De initielle resultatene fra Real Time PCR ble testet for tilstedeværelsen av genfragmenter i riktig størrelsesorden ved hjelp av agarose gelelektroforese (se 2.3.7). Det samme ble alle tvetydige resultater fra påfølgende kjøring av Real Time PCR.

### 2.3.6 Sekvensering av PCR-produkter

Den kromosomale *plcR*-genet ble sekvensert etter amplifisering av genet med endepunkts-PCR – en metode som skiller seg fra Real Time PCR hovedsakelig ved at man ikke følger reaksjonsutviklingen i sanntid eller kan benytte resultatene til kvantitering. Amplifiseringen må dermed bekreftes ved agarose gelelektroforese i etterkant av PCR-reaksjonen. For å designe primerne ble det utført et BLAST-søk for *plcR*-sekvensen til følgende stammer: *B. anthracis* str. A16 (GenBank Accession nr. CP001970.1), *B. thuringiensis* Bt 407 (GenBank Accession nr. CP003889.1), *B. cereus* AH820 (GenBank Accession nr. CP001283.1), *B. thuringiensis* serovar konkukian 97-92 (GenBank Accession nr. AE017355.1), *B. cereus* E33L (GenBank Accession nr. CP000001.1), *B. cereus* ATCC 10987 (GenBank Accession nr. AE017194.1), *B. cereus* FRI-35 (GenBank Accession nr. CP003747.1), *B. cereus* ATCC 14579 (GenBank Accession nr. AE016877.1), *B. thuringiensis* str. Al Hakam (GenBank Accession nr. CP000485.1) og *B. cereus* CI (GenBank Accession nr. CP001746.1). Samtlige sekvenser ble lagt inn i dataprogrammet MEGA6 (Tamura et al. 2013), og primerne ble designet ved hjelp av softwaren Primer3 (Untergasser et al. 2012). Primerne ble laget slik at hybridiserte utenfor *plcR*-regionen, slik at hele delen av genet ble amplifisert. Primerne hybridisere i regioner som var i størst mulig grad konserverte mellom de ulike stammene, som visualisert i programmet MEGA6. In silico PCR (Bikandi et al. 2004) ble brukt for å bekrefte at primerne kun ville amplifisere én region på kromosomet til *B. cereus*.

Primerparene *plcR-4* og *plcR-7* (tabell 2) ble brukt til sekvenseringsarbeidet. Primerparene amplifiserte hver sin del av genet, med en liten del overlappende sekvens på midten (Figur 5). Arbeidsløsning av hvert primerpar ble laget, med 5 µM av hver primer i RNAsefritt vann.

Følgende reaksjonsblanding ble brukt i endepunkts-PCR:

PCR-reaksjonsblanding (40 µL):

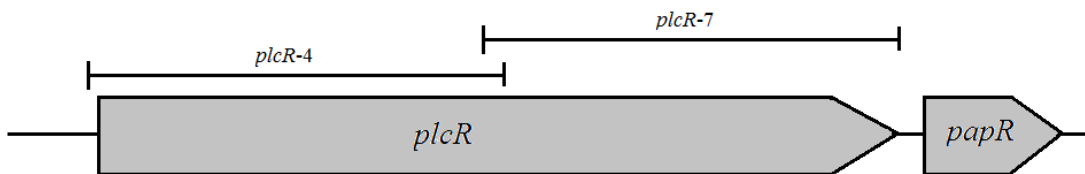
20 µL LightCycler 480 Probesmaster

8 µL arbeidsløsning med primere

8 µL RNAsefritt vann

4 µL DNA-templat (isolert som i 2.3.4)

Reaksjonen ble utført med 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) med følgende betingelser: Denaturering i 5 minutter ved 95 °C. Deretter 40 sykluser med denaturering ved 95 °C i 15 sekunder, annealing ved 58 °C i 15 sekunder og ekstensjon ved 72 °C i 40 sekunder. DNA fra stammen *B. anthracis* A31 ble brukt som positiv kontroll, og DNA fra *Legionella pneumophila* serogruppe 1 ble brukt som negativ kontroll. Samtlige resultater fra endepunkts-PCR ble bekreftet ved agarose gelektroforese (se under).



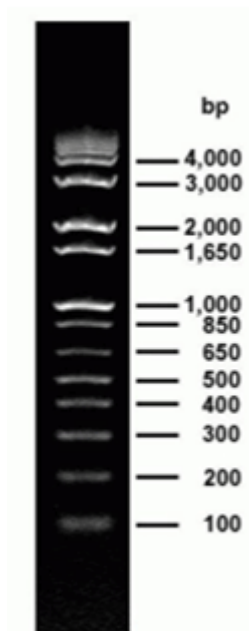
Figur 5.

Figuren viser hvilke regioner primerparene *plcR-4* og *plcR-7* amplifiserte i *plcR*-genet.

2x20 µL PCR-produkt (forward og reverse) fra hver prøve ble deretter sendt for DNA-sekvensering. Selve sekvenseringsarbeidet ble utført av Eurofins Genomics (Tyskland). Sekvenseringen ble utført med de samme primerparene som ble brukt til amplifisering av genet.

### 2.3.7 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en metode for separering av DNA-fragmenter, basert på størrelse. Negativt ladet DNA vil vandre gjennom gelen mot en positiv elektrode. Mindre DNA-fragmenter vil vandre lengre enn større fragmenter, fordi de mindre fragmentene lettere kan orientere seg gjennom agarosepolymerene i gelen. Gelen inneholder en substans (SYBR Safe, Invitrogen) som binder seg til dobbeltrådet DNA og får det til å fluorescere når det bestråles med UV-lys. For å bestemme størrelsen på fragmentene brukes en størrelsesmarkør (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) som inneholder DNA-fragmenter med kjente størrelser. Ved å sammenligne vandringslengden til DNA-fragmentene fra prøvene med vandringslengden til fragmentene i DNA-stigen, er det dermed mulig å finne den omtrentlige størrelsen på fragmentene man undersøker.



Figur 6.

Størrelsesmarkørene i 1 kb Plus DNA Ladder i 1 % agarosegel. De lysende båndene er DNA-fragmenter i ulike størrelser. Størrelsen til de ulike fragmentene er angitt til høyre (i antall basepar). Hentet fra [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

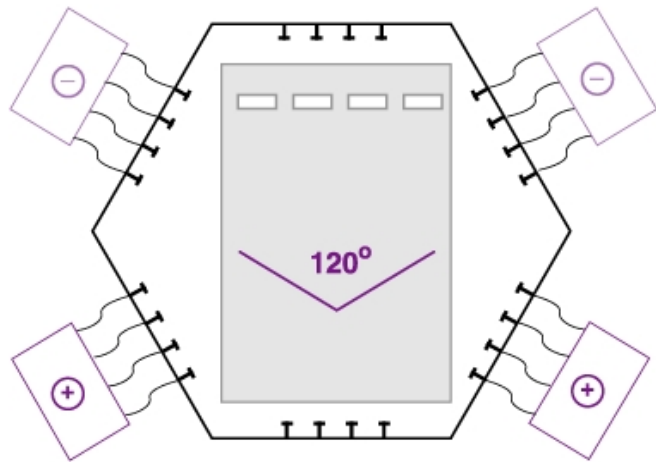
I denne studien ble det brukt en 1 % agarosegel (v/w) i 1x TBE-løsning. Gelen var tilsatt 10  $\mu$ L SYBR-safe for å merke dobbeltrådet DNA slik at de kunne visualiseres med UV-lys (ved fluorescens). 3,5  $\mu$ L av PCR-produktene som skulle undersøkes med agarose gelelektroforese ble blandet med 10  $\mu$ L loading buffer og deretter applisert i brønnene i gelen. 5  $\mu$ L 1 kb DNA ladder (Figur 6), som kan angir størrelser på fragmenter fra 100-ca. 4 000 basepar, ble tilsatt som størrelsesmarkør. Elektroforesen ble utført ved ca. 120 volt i 45 minutter, og resultatene ble visualisert med en Enduro GDS Touch (Labnet).

### 2.3.8 Pulsfelt gelelektroforese

Ordinær agarose gelelektroforese fungerer godt til å separere mindre DNA-fragmenter, men tillater ikke å skille fragmenter som er større enn 15-20kb, da slike fragmenter hovedsakelig vil vandre samlet gjennom gelen.

Pulsfelt gelelektroforese (PFGE) er en metode som minner om ordinær agarose gelelektroforese, men i motsetning til én positiv elektrode som trekker negativt ladete DNA-molekyler til seg, brukes det i PFGE to positive og to negative elektroder (2 elektrodepar) som alternerer mellom å være slått på (Figur 7). På denne måten blir de store DNA-fragmentene kontinuerlig trukket i litt forskjellig retning, og fragmentene klarer dermed lettere å orientere seg gjennom gelen. I denne studien ble PFGE brukt for å separere store plasmider fra utvalgte isolater, slik at de kunne karakteriseres på bakgrunn av størrelse.

Utvalgte isolater ble dyrket opp på TSA-plater og inkubert over natt ved 30 °C. En steril engangspodenål med bakteriekultur fra hver stamme ble inokulert i 10 mL LB-medium, og inkubert i rysteinkubator over natt ved 30 °C, ved 250 rpm. For hver overnattekultur ble 120 µL overført til 12 mL LB, og inkubert i rysteinkubator i 2-3 timer ved 30 °C, og 220 rpm. Optisk tetthet (optical density, OD) i hver prøve ble målt til ca. 0,6 og kloramfenikol ble da tilsatt hver prøve til en sluttkonsentrasjon på 180 µg/mL for å stoppe all proteinuttrykk i prøvene. Prøvene ble inkubert i ytterligere 1 time i rysteinkubator ved 30 °C, og 220 rpm. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 4500 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet, og bakteriepelletsene ble resuspendert i 10 mL PIV-løsning, og sentrifugert på nytt ved 4500 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet på nytt, og bakteriepelletene suspendert i 1,1 mL PIV-løsning. Hver prøve ble varmet opp til 42 °C på vannbad, og tilsatt 0,5 mL 2,6 % low melting point agarose. Hver prøve ble tilsatt en rad med former til gelpluggen. Når gelpluggene med

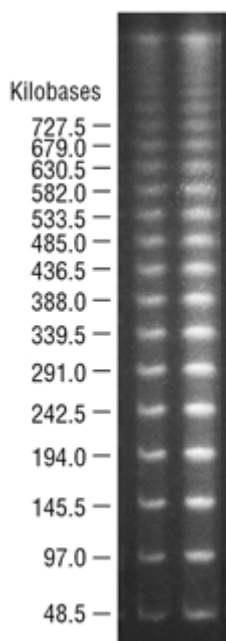


Figur 7.

Figuren viser hvor elektrodene er plassert i forhold til brønnene på gelen. Pluss- og minus-elektrodene på hver side av gelen alternerer mellom å være slått av og på for å trekke de negativt ladete plasmidene mot de positive elektrodene ved bunnen av gelen. Hentet fra [http://uvmgg.wikia.com/wiki/Pulsed\\_Field\\_Gel\\_Electrophoresis](http://uvmgg.wikia.com/wiki/Pulsed_Field_Gel_Electrophoresis)

bakteriekulturer hadde stivnet ble alle gelpluggene fra hver prøve dyttet ut, over i 50 mL rør tilsatt 4 mL løsning 3. Prøvene ble inkubert overnatt på rystevannbad ved 50 °C, for å lysere bakteriecellene. Løsning 3 ble fjernet fra alle prøvene, og nye 4 mL løsning 3 ble tilsatt. Prøvene ble på nytt inkubert overnatt på rystevannbad ved 50 °C. Løsning 3 ble fjernet fra prøvene, og de ble hver tilsatt 2 mL ESP-løsning og inkubert overnatt på rystevannbad ved 50 °C, for å fjerne proteiner som skulle være tilstede. Dette ble gjentatt ytterligere to ganger, inntil gelpluggene ble observert som blanke.

Én gelplugg fra hver prøve ble applisert i hver brønn på 1 % Low Melting Point-agarosegelen, og forseglet med flytende 1 % Low Melting Point-agarose. Lambdaladder ble brukt som størrelsesmarkør (Figur 8). Elektroforesen ble utført i et Geneline (Beckman) PFGE-apparat med følgende program:



Program 1:

170 mA, 10 minutter, 4 sekunder på hver elektrode

Etterfulgt av:

Program 2:

150 mA, 20 timer, 60 sekunder på hver elektrode

Gelen ble deretter farget med 80µL Etidiumbromid 5 mg/mL blandet i 100 mL destillert vann, og deretter avfarget med destillert vann.

Resultatene ble visualisert med en standard UV transilluminator.

Figur 8.

Størrelsesmarkøren Lamdaladder i 1 % Low Melting Point-agarose. De lysende båndene er DNA-fragmenter i ulike størrelser. Størrelsen til de ulike fragmentene er angitt til høyre (i antall kilobaser). Hentet fra [www.neb.com](http://www.neb.com)



# 3 Resultater

## 3.1 Koloni- og cellemorfologi

Isolatene FFIBCgr1-85 ble karakterisert på bakgrunn av koloni- og cellemorfologi for å identifisere mulige likhetstrekk til *B. anthracis*, som skiller seg fra *B. cereus* og *B. thuringiensis* ved at koloniene vanligvis er større, mer irregulære med en røffere tekstur, og cellene vanligvis vokser sammen i lange kjeder med firkantet tupp. Kolonier av *B. cereus* og *B. thuringiensis* er mindre og vanligvis sirkulære, og cellene vokser vanligvis enkeltvis eller parvis, og har mer avrundet tupp (Balows et al. 1991). På grunn av mangel på tid ble dette arbeidet ikke utført på FFIBCgr86-147.

### 3.1.1 Kolonimorfologi

Nedfrosne bakteriekulturer (-72 °C) ble spredt ut på TSAskål, og inkubert ved 30 °C i 24 timer. Enkeltkolonier ble karakterisert etter følgende kriterier: form, elevasjon, kant, farge, tekstur og kolonistørrelse (tabell 3). Isolatene varierte mellom sirkulær og irregulær koloniform, konveks og hevet elevasjon, hel og undulat (bølget), kant, ulike nyanser av gul kolonifarge, og glatt, matt og ruglete/sprukken tekstur. De minste enkeltkoloniene var nede i 1 mm i diameter, og de største oppe i 5 mm. Forskjellene mellom konveks og hevet elevasjon var ganske marginale, så det kunne være problematisk å klassifisere dem i den ene eller andre kategorien. Det var også noe glidende overganger mellom de ulike kolonifargene, og det syntes ikke ut til å nødvendigvis være noen sterk sammenheng mellom de ulike nyansene av gulfarge og andre karakteristikk. Derimot viste det seg å være en sammenheng mellom koloniform, kant og kolonistørrelse. Stammene med irregulær koloniform hadde i de fleste tilfeller undulat kant, og koloniene var jevnt over noe større enn de andre koloniene; de fleste av disse koloniene var oppe i 4-5 mm i diameter, mens stammene med sirkulær koloniform var generelt 2-4 mm. Det var enkelte unntak med hensyn på dette, blant annet FFIBCgr54, som hadde irregulær koloniform, med en kolonistørrelse på 2-3 mm. Isolatene FFIBCgr37, 67 og 85 hadde alle sirkulær koloniform, men hadde alle enkeltkolonier helt oppe i 5 mm. Tre stammer, FFIBCgr52, 54 og 85, produserte også påfallende slimetekolonier etter vekst over natt på skål.

Tabell 3: Kolonimorfologi hos *B. cereus*-gruppeisolatene etter FFIBCgr1-FFIBCgr85 etter 24 timer vekst på TSA-plate ved 30 °C.

Kolonimorfologi							
Isolat	Form	Elevasjon	Kant	Farge	Tekstur	Koloni-størrelse	Annet
FFIBCgr1	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr2	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr3	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	3-4mm	
FFIBCgr4	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Sprukket/ruglete	2-3mm	
FFIBCgr5	Irregulær	Konveks	Undulat	Gul	Ruglete	3-4mm	
FFIBCgr6	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Sprukket/ruglete	2-3mm	
FFIBCgr7	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr8	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Sprukket/ruglete	2-3mm	
FFIBCgr9	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr10	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr11	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr12	Sirkulær	Konveks	Hel	Brungul	Matt	3-4mm	
FFIBCgr13	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr14	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Sprukket/ruglete	2-3mm	
FFIBCgr15	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr16	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	3-4mm	
FFIBCgr17	Irregulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	3-4mm	
FFIBCgr18	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	3-4mm	
FFIBCgr19	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	3-4mm	
FFIBCgr20	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-4mm	
FFIBCgr21	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	3-4mm	
FFIBCgr22	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr23	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr24	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr25	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	3-4mm	
FFIBCgr26	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr27	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr28	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr29	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr30	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr31	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
FFIBCgr32	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr33	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
FFIBCgr34	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	
FFIBCgr35	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	

<b>FFIBCgr36</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr37</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	3-5mm	
<b>FFIBCgr38</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-4mm	
<b>FFIBCgr39</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-4mm	
<b>FFIBCgr40</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr41</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-4mm	
<b>FFIBCgr42</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-4mm	
<b>FFIBCgr43</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-4mm	
<b>FFIBCgr44</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr45</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
<b>FFIBCgr46</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
<b>FFIBCgr47</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr48</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr49</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
<b>FFIBCgr50</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-4mm	
<b>FFIBCgr51</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	1-2mm	
<b>FFIBCgr52</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Ruglete	2-3mm	Veldig slimete etter 24t
<b>FFIBCgr53</b>	Sirkulær	Konveks	Undulat	Grågul	Ruglete	2-4mm	
<b>FFIBCgr54</b>	Irregulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	Veldig slimete etter 24t
<b>FFIBCgr55</b>	Irregulær	Konveks	Undulat	Grågul	Ruglete	3-5mm	
<b>FFIBCgr56</b>	Irregulær	Konveks	Undulat	Grågul	Ruglete	2-4mm	
<b>FFIBCgr57</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Ruglete	3-4mm	
<b>FFIBCgr58</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gul	Ruglete	1-3mm	
<b>FFIBCgr59</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr60</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr61</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	2-3mm	
<b>FFIBCgr62</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
<b>FFIBCgr63</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-5mm	
<b>FFIBCgr64</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-5mm	
<b>FFIBCgr65</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Gulhvit	Matt	3-4mm	
<b>FFIBCgr66</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Matt	2-3mm	
<b>FFIBCgr67</b>	Sirkulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr68</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-5mm	
<b>FFIBCgr69</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr70</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4mm	
<b>FFIBCgr71</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr72</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr73</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr74</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	

<b>FFIBCgr75</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4mm	
<b>FFIBCgr76</b>	Irregulær	Hevet	Hel	Grågul	Matt	3-5mm	
<b>FFIBCgr77</b>	Irregulær	Hevet	Hel	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr78</b>	Irregulær	Hevet	Hel	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr79</b>	Irregulær	Hevet	Hel	Grågul	Matt	3-4mm	
<b>FFIBCgr80</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	4-5mm	
<b>FFIBCgr81</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	2-5mm	
<b>FFIBCgr82</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-4mm	
<b>FFIBCgr83</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-5mm	
<b>FFIBCgr84</b>	Irregulær	Hevet	Undulat	Grågul	Ruglete	3-4mm	
<b>FFIBCgr85</b>	Sirkulær	Konveks	Hel	Grågul	Glatt	4-5mm	Veldig slimete etter 24 t

### 3.1.2 Lysmikroskopi

Nedfrosne bakteriekulturer (-72 °C) ble spredt ut på TSA-skål, og inkubert ved 30 °C. Isolatene FFIBCgr1-85 ble inspisert i lysmikroskop etter 24 timer, ved at en podenål med bakterier fra kanten av en enkeltkoloni ble påført objektglass, påført 2 µL vann og dekket med objektglass. Bakteriece llene ble karakterisert etter følgende kriterier: antall celler som vokste sammen og om de eventuelt vokste i lange kjeder, celletupp og cellelengde. Etter inkubasjon med samme betingelser i 48 timer ble isolatene på nytt inspisert i lysmikroskop for tilstedeværelse av krystalltoksiner ved sporulerende celler, som indikerer *B. thuringiensis*. Resultatene er oppgitt i tabell 4. Isolatene varierte i cellelengde fra 3-10 µm, og det kunne være stor variasjon i cellelengde innenfor ett isolat. FFIBCgr51 skilte seg fra de øvrige isolatene, med celler som var oppe i 12 µm. Isolater som konsekvent vokste i kjeder på ca. 15 celler eller mer ble klassifisert som kjededannende. I alt ble 27 isolater klassifisert som kjededannende isolater (~32 % av de undersøkte isolatene). FFIBCgr30 representerer et grensetilfelle, og hadde noen kjeder på ca. 10 sammenhengende celler. 21 av de kjededannede isolatene ble observert å ha celletupp som var både runde og firkantete, mens alle de resterende isolatene hadde kun runde celletupper. Analysene av morfologi på celletupp var i noen tilfeller vanskelige når cellene vokste i kjeder, som følge av at cellene vokste så tett sammen. Etter inkubasjon i 48 timer kunne celler som hadde sporulert observeres som store lysfraktile objekter i lysmikroskopet. Ikke alle isolater hadde sporulert på dette tidspunkt, og dette gjaldt kun kjededannende isolater. Mange av disse hadde til gjengjeld fått drastisk endring i celled morfologien, hvor cellene hadde blitt noe kortere og rundere og var fylt med flere små lysende flekker, som ikke lignet endosporen i de ikke-kjededannende isolatene.

Bilder av utvalgte stammer er vist i Figur 9. Kun isolatet FFIBCgr76 hadde en mulig krystallinklusjon i sporulerende celler som kan tenkes å være krystalltoksin. Det er noe usikkerhet knyttet til dette resultatet på grunn av vanskeligheter med definitiv identifisering av krystalltoksin i cellene. Samtlige isolater som sporulerte etter 48 timer, hadde ikke oppsvulmet sporiangium, og dannet sentrale, subterminale eller terminale endosporer, som er vanlig for organismer i *B. cereus*-gruppen (Balows et al. 1991) (ikke vist i tabellen).

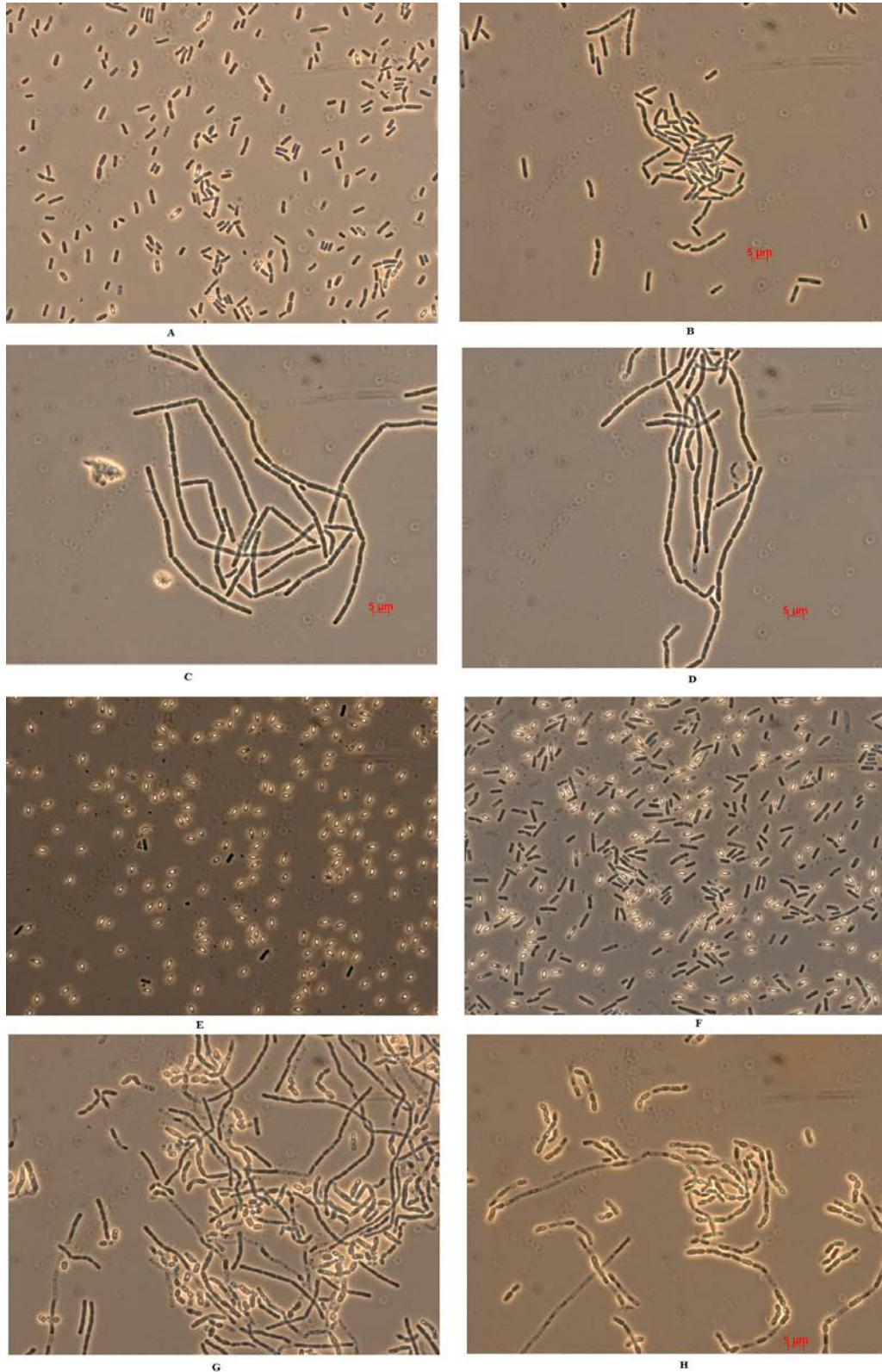
**Tabell 4: Cellemorfologi hos isolatene FFIBCgr1-85 som observert i lysmikroskop etter 24 timer vekst på TSA-plate ved 30 °C, og eventuelle observasjoner etter 48 timer vekst på TSA-plate ved 30 °C.**

Isolat	Cellemorfologi i mikroskop etter 24 timer					Etter 48 timer	
	Antall celler sammen	Tupp	Lengde	Kjededannelse	Annet	Krystalltoksin	Annet
FFIBCgr1	1-4	Rund	3-5µm	-		-	
FFIBCgr2	1-4	Rund	3-5µm	-		-	Veldig seig etter 48 t
FFIBCgr3	1-4	Rund	3-5µm	-		-	Veldig seig etter 48 t
FFIBCgr4	1-4	Rund	3-5µm	-		-	
FFIBCgr5	1-30	Rund/firkantet	3-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
FFIBCgr6	1-4	Rund	3-10µm	-		-	
FFIBCgr7	1-6	Rund	3-6µm	-		-	
FFIBCgr8	1-4	Rund	3-10µm	-		-	
FFIBCgr9	1-4	Rund	4-10µm	-		-	**
FFIBCgr10	1-4	Rund	3-10µm	-		-	
FFIBCgr11	1-4	Rund	3-5µm	-		-	
FFIBCgr12	1-4	Rund	3-9µm	-		-	
FFIBCgr13	1-4	Rund	3-5µm	-		-	
FFIBCgr14	1-4	Rund	3-5µm	-		-	
FFIBCgr15	1-4	Rund	3-8µm	-		-	
FFIBCgr16	1-30	Rund	3-10µm	+		-	
FFIBCgr17	1-4	Rund	3-7µm	-		-	
FFIBCgr18	1-4	Rund	3-10µm	-	*	-	
FFIBCgr19	1-4	Rund	3-6µm	-	*	-	Veldig seig etter 48 t
FFIBCgr20	1-4	Rund	3-9µm	-	*	-	
FFIBCgr21	1-6	Rund	3-6µm	-		-	
FFIBCgr22	1-6	Rund	3-8µm	-	*	-	
FFIBCgr23	1-7	Rund	3-8µm	-		-	
FFIBCgr24	1-4	Rund	3-8µm	-	*	-	
FFIBCgr25	1-4	Rund	3-6µm	-	*	-	
FFIBCgr26	1-6	Rund	3-6µm	-	*	-	
FFIBCgr27	1-4	Rund	3-8µm	-		-	
FFIBCgr28	1-5	Rund	5-8µm	-	*	-	
FFIBCgr29	1-4	Rund	3-10µm	-	*	-	

<b>FFIBCgr30</b>	1-8	Rund	3-10µm	(+)	Enkelte lengre kjeder på rundt 10 celler	-	
<b>FFIBCgr31</b>	1-4	Rund	3-10µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr32</b>	1-7	Rund	3-10µm	-		Hadde ikke sporulert	
<b>FFIBCgr33</b>	1-6	Rund	3-7µm	-		-	
<b>FFIBCgr34</b>	1-4	Rund	3-8µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr35</b>	1-7	Rund	4-6µm	-		-	
<b>FFIBCgr36</b>	1-5	Rund	3-5µm	-		-	
<b>FFIBCgr37</b>	1-3	Rund	3-6µm	-		-	
<b>FFIBCgr38</b>	4-15	Rund/firkantet	3-7µm	+		-	
<b>FFIBCgr39</b>	1-4	Rund	3-8µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr40</b>	1-4	Rund	3-10µm	-		-	
<b>FFIBCgr41</b>	1-6	Rund	3-8µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr42</b>	1-5	Rund	3-6µm	-		-	
<b>FFIBCgr43</b>	1-5	Rund	3-5µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr44</b>	1-4	Rund	3-6µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr45</b>	1-4	Rund	3-8µm	-		-	
<b>FFIBCgr46</b>	1-4	Rund	3-6µm	-		-	
<b>FFIBCgr47</b>	1-4	Rund	3-8µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr48</b>	1-8	Rund	3-5µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr49</b>	1-4	Rund	3-6µm	-		-	
<b>FFIBCgr50</b>	1-4	Rund	4-10µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr51</b>	1-4	Rund	3-12µm	-	*	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr52</b>	2-30	Rund/firkantet	3-8µm	+		-	
<b>FFIBCgr53</b>	1-4	Rund	4-6µm	-		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr54</b>	2-30	Rund	4-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr55</b>	2-30	Rund	3-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr56</b>	2-30	Rund	4-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr57</b>	2-30	Rund/firkantet	3-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr58</b>	2-30	Rund	4-7µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr59</b>	2-30	Rund/firkantet	3-5µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr60</b>	1-4	Rund	3-8µm	-		-	
<b>FFIBCgr61</b>	1-4	Rund	3-8µm	-		-	
<b>FFIBCgr62</b>	1-4	Rund	3-8µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr63</b>	2-30	Rund/firkantet	3-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr64</b>	1-40	Rund/firkantet	4-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr65</b>	1-4	Rund	4-7µm	-		-	
<b>FFIBCgr66</b>	1-6	Rund	3-10µm	-	*	-	
<b>FFIBCgr67</b>	1-50	Rund/firkantet	4-6µm	+		Hadde ikke sporulert	**

<b>FFIBCgr68</b>	1-30	Rund/firkantet	3-6µm	+	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr69</b>	1-30	Rund/firkantet	4-6µm	+	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr70</b>	1-30	Rund/firkantet	4-5µm	+	-	**
<b>FFIBCgr71</b>	1-40	Rund/firkantet	3-5µm	+	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr72</b>	1-40	Rund/firkantet	5-6µm	+	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr73</b>	1-40	Rund/firkantet	3-5µm	+	Hadde ikke sporulert	**
<b>FFIBCgr74</b>	1-30	Rund/firkantet	4-8µm	+	-	**
<b>FFIBCgr75</b>	1-40	Rund/firkantet	4-7µm	+	-	**
<b>FFIBCgr76</b>	1-4	Rund	4-8µm	-	(+)	
<b>FFIBCgr77</b>	1-6	Rund	3-6µm	-	-	
<b>FFIBCgr78</b>	1-6	Rund	3-5µm	-	-	
<b>FFIBCgr79</b>	1-6	Rund	4-7µm	-	-	Veldig seig etter 48 t
<b>FFIBCgr80</b>	1-40	Rund/firkantet	3-7µm	+	-	**
<b>FFIBCgr81</b>	1-40	Rund/firkantet	2-7µm	+	-	**
<b>FFIBCgr82</b>	1-20	Rund/firkantet	3-6µm	+	-	**
<b>FFIBCgr83</b>	1-20	Rund/firkantet	3-6µm	+	-	**
<b>FFIBCgr84</b>	1-20	Rund/firkantet	3-8µm	+	-	**
<b>FFIBCgr85</b>	1-4	Rund	4-6µm	-	-	
<hr/>						
*	Enkelte veldig lange celler, kan ha vært flere celler sammen					
**	Mange lysende flekker inne i cellene. Cellene skrumpet sammen og ble rundere					
(+)	Mulig krystalltoksin					





**Figur 9.**

Mikroskopbilder av utvalgte isolater, tatt etter 24 og 48 timer vekst på TSA-skål ved 30 °C med 100x zoom tatt med lysmikroskop. Endosporer kan sees som store lysende (lysrefraktile) flekker inne i cellene. C, D, G og H ble alle klassifisert som kjededannende stammer. A) FFIBCgr1 etter 24 timer, B) FFIBCgr27 etter 24 timer, C) FFIBCgr54 etter 24 timer, D) FFIBCgr74 etter 24 timer, E) FFIBCgr19 etter 48 timer, F) FFIBCgr43 etter 48 timer, G) FFIBCgr5 etter 48 timer, H) FFIBCgr83 etter 48 timer.



## 3.2 Motilitet og penicillinfølsomhet

Motilitet og penicillinfølsomhet er vanlige fenotypiske trekk som kan skille *B. anthracis* fra *B. cereus* og *B. thuringiensis*, ved at *B. anthracis* er non-motil og følsom for penicillin, mens de to øvrige er motile og penicillinresistente som følge av betalaktamaseproduksjon. Isolatene FFIBCgr1-85 ble testet for motilitet og penicillinfølsomhet (tabell 5). Isolatene ble undersøkt for motilitet i lysmikroskop etter 2-3 timer på TSB-medium ved 30 °C og 125 rpm. Motile isolater var da lette å se i mikroskopet, spesielt ved endene av dekkglasset, hvor oksygentilgangen er høyest. I alt 25 av 85 isolater var nonmotile (~29 %). Isolatene ble undersøkt for penicillinfølsomhet ved at en podenål med bakteriekultur ble suspendert i 200 µL TSB-medium. Av dette ble 100 µL bakteriesuspensjon spredt utover en TSA-skål. En penicillindisk ble plassert midt på TSA-skålen, og inkubert ved 30 °C i 24 timer. Isolater som hadde en synlig sonet med hemmet vekst rundt penicillindisken ble klassifisert som penicillinfølsomme. Tre av 85 isolater, FFIBCgr52, FFIBCgr82 og FFIBCgr84, utviste følsomhet for Penicillin G (~3,5 %).

Tabell 5: Resultat fra motilitetstest og penicillinfølsomhetstest for isolatene FFIBCgr1-85.

Isolat	Motilitet	Penicillin G-følsomhet	Isolat	Motilitet	Penicillin G-følsomhet
FFIBCgr1	+	-	FFIBCgr22	+	-
FFIBCgr2	+	-	FFIBCgr23	+	-
FFIBCgr3	+	-	FFIBCgr24	+	-
FFIBCgr4	+	-	FFIBCgr25	+	-
FFIBCgr5	-	-	FFIBCgr26	+	-
FFIBCgr6	+	-	FFIBCgr27	+	-
FFIBCgr7	+	-	FFIBCgr28	+	-
FFIBCgr8	+	-	FFIBCgr29	+	-
FFIBCgr9	+	-	FFIBCgr30	+	-
FFIBCgr10	+	-	FFIBCgr31	+	-
FFIBCgr11	+	-	FFIBCgr32	+	-
FFIBCgr12	+	-	FFIBCgr33	+	-
FFIBCgr13	+	-	FFIBCgr34	+	-
FFIBCgr14	+	-	FFIBCgr35	+	-
FFIBCgr15	+	-	FFIBCgr36	+	-
FFIBCgr16	+	-	FFIBCgr37	+	-
FFIBCgr17	+	-	FFIBCgr38	-	-
FFIBCgr18	+	-	FFIBCgr39	+	-
FFIBCgr19	+	-	FFIBCgr40	+	-
FFIBCgr20	+	-	FFIBCgr41	+	-
FFIBCgr21	+	-	FFIBCgr42	+	-

Isolat	Motilitet	Penicillin G-følsomhet	Isolat	Motilitet	Penicillin G-følsomhet
FFIBCgr43	+	-	FFIBCgr65	+	-
FFIBCgr44	+	-	FFIBCgr66	+	-
FFIBCgr45	+	-	FFIBCgr67	-	-
FFIBCgr46	+	-	FFIBCgr68	-	-
FFIBCgr47	+	-	FFIBCgr69	-	-
FFIBCgr48	+	-	FFIBCgr70	-	-
FFIBCgr49	+	-	FFIBCgr71	-	-
FFIBCgr50	+	-	FFIBCgr72	-	-
FFIBCgr51	+	-	FFIBCgr73	-	-
FFIBCgr52	-	1-2mm hemningssone, med noen enkeltkolonier innenfor sonen	FFIBCgr74	-	-
FFIBCgr53	+	-	FFIBCgr75	-	-
FFIBCgr54	-	-	FFIBCgr76	+	-
FFIBCgr55	-	-	FFIBCgr77	+	-
FFIBCgr56	-	-	FFIBCgr78	+	-
FFIBCgr57	-	-	FFIBCgr79	+	-
FFIBCgr58	-	-	FFIBCgr80	-	-
FFIBCgr59	-	-	FFIBCgr81	-	-
FFIBCgr60	+	-	FFIBCgr82	-	2-4mm hemningssone, med noen enkeltkolonier innenfor sonen
FFIBCgr61	+	-	FFIBCgr83	-	-
FFIBCgr62	+	-	FFIBCgr84	-	2-3mm hemningssone, med noen enkeltkolonier innenfor sonen
FFIBCgr63	-	-	FFIBCgr85	+	-
FFIBCgr64	-	-			

### 3.3 pXO1- og pXO2-lignende plasmider

Isolatene FFIBCgr1-147 ble screenet for tilstedeværelsen av pXO1- og pXO2-lignende plasmider ved Real Time PCR med primere for spesifikke markørgener. Slike plasmider deler en konservert ryggradregion med henholdsvis *B. anthracis* sine virulensplasmider pXO1 og pXO2, uten at de nødvendigvis er involvert i virulens (se 1.6.1). Genene *repX* og pXO1-58 ble benyttet som markører for tilstedeværelsen av pXO1-lignende plasmider. *repX* er et gen som er involvert i plasmidreplikasjonen til pXO1-lignende plasmider, og pXO1-58 koder for et hypotetisk protein (Rasko et al. 2007). Markøren *repA* er et protein involvert i plasmidreplikasjonen til pXO2-lignende plasmider og indikerer tilstedeværelsen av pXO2-lignende plasmider (Bahl og Rosenberg 2010). Det ble kjørt tre paralleller for hver markør på hvert isolat, og resultatene er vist i tabell 6. Det var forventet at *repX* og pXO1-58 skulle gi identisk utslag i screening-prosessen, noe som viste seg å ikke nødvendigvis være tilfelle. I alt 52 isolater ga positivt utslag for pXO1-58 og 22 isolater ga positivt utslag for *repX*. Av disse

var det kun 13 isolater som ga positivt utslag for begge markørene. *repA* ga positivt utslag på 13 isolater, men isolatet FFIBCgr33 hadde amplifisert et fragment på ~400 bp, som var ca. 300 bp mindre enn forventet. Totalt tre isolater ga positivt utslag for alle tre markører (FFIBCgr3, FFIBCgr114 og FFIBCgr121). Resultatene fra Real Time PCR-screeningen ble bekreftet ved agarose gelelektroforese av 3,5 µL PCR-produkt, for å bekrefte at de amplifiserte fragmentene var i riktig størrelsesorden (tabell 2). Eksempler fra utvalgte isolater er vist Figur 10, Figur 11 og Figur 12.

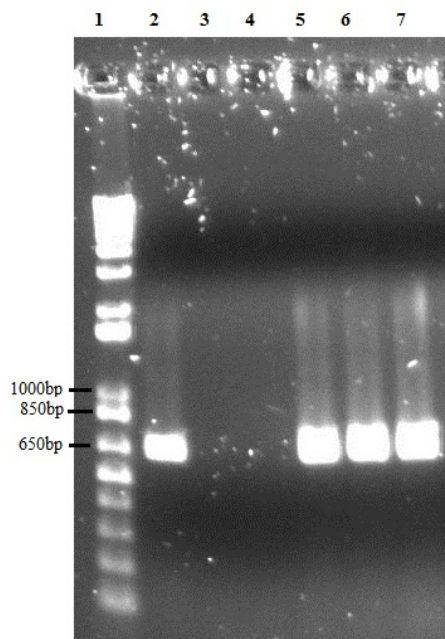
Tabell 6: Resultater fra screening for pXO1- og pXO2-lignende plasmider.

Isolat	RepX	pXO1-58	RepA	Isolat	RepX	pXO1-58	RepA
FFIBCgr1	-	-	-	FFIBCgr32	-	-	-
FFIBCgr2	-	-	-	FFIBCgr33	-	-	(+)
FFIBCgr3	+	+	+	FFIBCgr34	-	+	-
FFIBCgr4	-	-	-	FFIBCgr35	-	+	-
FFIBCgr5	-	-	-	FFIBCgr36	-	-	-
FFIBCgr6	-	-	-	FFIBCgr37	-	-	-
FFIBCgr7	-	+/-	-	FFIBCgr38	-	-	-
FFIBCgr8	-	-	-	FFIBCgr39	-	-	-
FFIBCgr9	-	-	-	FFIBCgr40	-	-	-
FFIBCgr10	-	-	-	FFIBCgr41	+	+	-
FFIBCgr11	-	-	-	FFIBCgr42	-	+	-
FFIBCgr12	-	-	-	FFIBCgr43	-	-	-
FFIBCgr13	-	-	-	FFIBCgr44	-	-	-
FFIBCgr14	-	+	-	FFIBCgr45	-	-	-
FFIBCgr15	+	+	-	FFIBCgr46	-	-	-
FFIBCgr16	+	-	-	FFIBCgr47	-	-	-
FFIBCgr17	-	-	-	FFIBCgr48	-	-	-
FFIBCgr18	-	-	-	FFIBCgr49	-	+	-
FFIBCgr19	-	+	-	FFIBCgr50	-	-	-
FFIBCgr20	+	-	-	FFIBCgr51	-	-	-
FFIBCgr21	+	-	-	FFIBCgr52	-	-	-
FFIBCgr22	-	-	-	FFIBCgr53	+	+	-
FFIBCgr23	-	+	-	FFIBCgr54	-	-	-
FFIBCgr24	+	-	-	FFIBCgr55	-	-	-
FFIBCgr25	-	+	-	FFIBCgr56	-	-	-
FFIBCgr26	+	-	-	FFIBCgr57	-	-	-
FFIBCgr27	+	-	-	FFIBCgr58	-	-	-
FFIBCgr28	-	+	-	FFIBCgr59	-	-	-
FFIBCgr29	-	-	-	FFIBCgr60	-	+	-
FFIBCgr30	-	+	-	FFIBCgr61	-	+	-
FFIBCgr31	+	+	-	FFIBCgr62	-	-/+	-

Isolat	RepX	pXO1-58	RepA	Isolat	RepX	pXO1-58	RepA
FFIBCgr63	-	+	-	FFIBCgr106	-	-	-
FFIBCgr64	-	-	-	FFIBCgr107	-	-	-
FFIBCgr65	-	+	-	FFIBCgr108	-	-	-
FFIBCgr66	-	-	-	FFIBCgr109	-	-	-
FFIBCgr67	-	+	-	FFIBCgr110	-	-	-
FFIBCgr68	-	-/+	-	FFIBCgr111	-	-/+	-
FFIBCgr69	-	+	-	FFIBCgr112	-	+	-
FFIBCgr70	-	-	-	FFIBCgr113	-	-	-
FFIBCgr71	-	-	-	FFIBCgr114	+/-	+	+
FFIBCgr72	-	-	-	FFIBCgr115	-	+	+/-
FFIBCgr73	-	+	-	FFIBCgr116	+	+/-	-
FFIBCgr74	-	+	-	FFIBCgr117	+	-	-
FFIBCgr75	-	-	-	FFIBCgr118	+	-	-
FFIBCgr76	-	+	-	FFIBCgr119	-	-	+
FFIBCgr77	+	+	-	FFIBCgr120	+	-	-
FFIBCgr78	-	+	-	FFIBCgr121	+	+	+
FFIBCgr79	-	+	-	FFIBCgr122	-	-	-
FFIBCgr80	-	+	-	FFIBCgr123	-	-	-
FFIBCgr81	-	+	-	FFIBCgr124	-	-	-
FFIBCgr82	-	+	-	FFIBCgr125	-	-	-
FFIBCgr83	-	+	-	FFIBCgr126	-	-	-
FFIBCgr84	-	+	-	FFIBCgr127	-	-	-
FFIBCgr85	-	+	-	FFIBCgr128	-	-	-
FFIBCgr86	+	+	-	FFIBCgr129	-	-	-
FFIBCgr87	-	-	-	FFIBCgr130	-	-	+
FFIBCgr88	-	-	-	FFIBCgr131	-	-	-
FFIBCgr89	+	+	-	FFIBCgr132	-	-	+
FFIBCgr90	-	-	-	FFIBCgr133	-	-	-
FFIBCgr91	-	-	+	FFIBCgr134	-	-	-
FFIBCgr92	-	-	-	FFIBCgr135	-	+	-
FFIBCgr93	-	-	-	FFIBCgr136	-	-	-
FFIBCgr94	-	-	-	FFIBCgr137	-	-	-
FFIBCgr95	-	-	-	FFIBCgr138	-	-	-
FFIBCgr96	-	-/+	-	FFIBCgr139	-	-	+/-
FFIBCgr97	+	+	-	FFIBCgr140	-	-	-
FFIBCgr98	-	+	-	FFIBCgr141	-	-	-
FFIBCgr99	-	+/-	+	FFIBCgr142	-	-	+
FFIBCgr100	+	+	-	FFIBCgr143	-	-	+
FFIBCgr101	-	-	-	FFIBCgr144	-	-	-
FFIBCgr102	-	-	-	FFIBCgr145	-	-	-
FFIBCgr103	-	-	-	FFIBCgr146	-	-	-
FFIBCgr104	-	-/+	-	FFIBCgr147	-	-	-
FFIBCgr105	-	-/+	-				

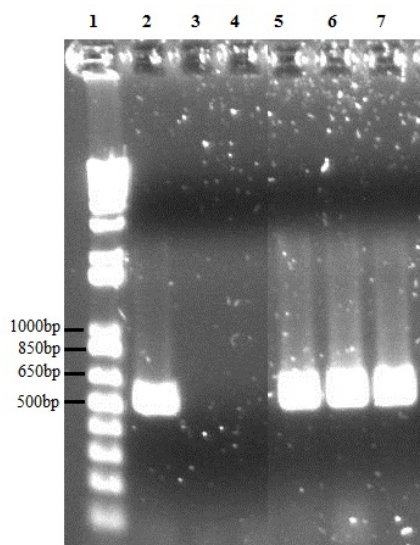
+/- : 2 av 3 paralleller var positive

-/+ : 1 av 3 paralleller var positive



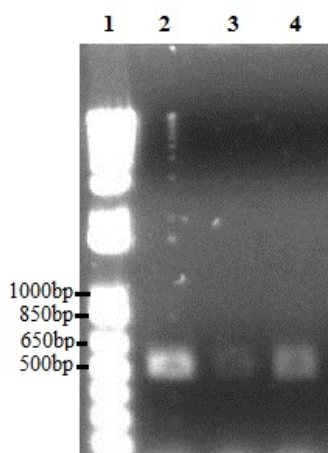
Figur 10.

Agarose gelelektroforese av PCR-produkter etter PCR-screening for markøren *repA* isolatet FFIBCGr119. 1) 1kb Plus Ladder (Invitrogen), 2) positiv kontroll (*B. anthracis* A31), 3) negativ kontroll (*B. cereus* ATCC 14579), 4) tom brønn, 5-7) FFIBCGr119



Figur 11.

Agarose gelelektroforese av PCR-produkter etter PCR-screening for markøren *pXO1-58* i isolatet FFIBCGr65. 1) 1kb Plus Ladder (Invitrogen), 2) Positiv kontroll (*B. anthracis* A31), 3) Negativ kontroll (*B. cereus* ATCC 14579), 4) tom brønn 5-7) FFIBCGr65

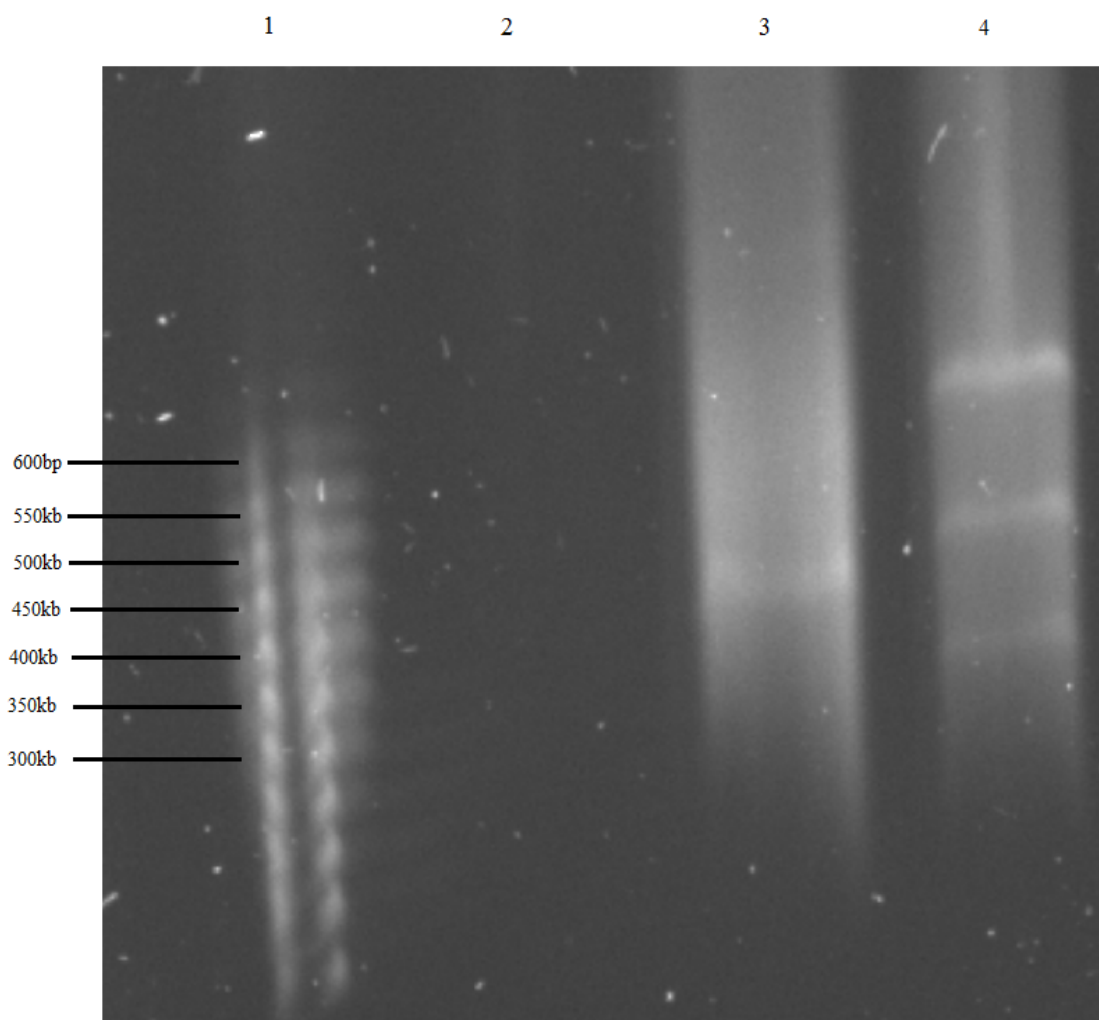


Figur 12.

Agarose gelelektroforese av PCR-produkter FFIBCGr24 etter PCR-screening for markøren *repX* i isolatet FFIBCGr24. 1) 1kb Plus Ladder (Invitrogen), 2) Positiv kontroll (*B. anthracis* A31), 3-4) FFIBCGr24.

### 3.4 Pulsfeltgelelektroforese

Pulsfeltgelelektroforese (PFGE) ble utført på isolatene FFIBCgr3, FFIBCgr15, FFIBCgr20, FFIBCgr53, FFIBCgr60, FFIBCgr73, FFIBCgr77 og FFIBCgr84, som alle hadde blitt bekreftet å inneholde minst ett plasmid av plasmidene fra screeningen av pXO1- og pXO2-lignende plasmider (se 3.3). Ved PFGE separerer man store DNA-fragmenter basert på deres størrelser, og dette ble gjort for å undersøke størrelsen på plasmidene til de utvalgte isolatene. Bilde fra PFGE-analysen er vist i Figur 13. Isolatene FFIBCgr15 og FFIBCgr20, ga positive resultater. FFIBCgr15 ble bekreftet å ha ett plasmid på omtrent 400 kb, og FFIBCgr20 hadde tre plasmider på omtrent 300, 450 og 600 kb.



Figur 13.

Resultat fra PFGE-analyser for plasmidkartlegging i utvalgte isolater FFIBCgr15 ga et svakt bånd på omtrent 400 kb, og FFIBCgr20 tre bånd på henholdsvis 300 kb, 450 kb og 600 kb 1) Lamdaladder størrelsesmarkør (NEB), 2) FFIBCgr3 DNA, 3) FFIBCgr15 DNA, 4) FFIBCgr20 DNA.

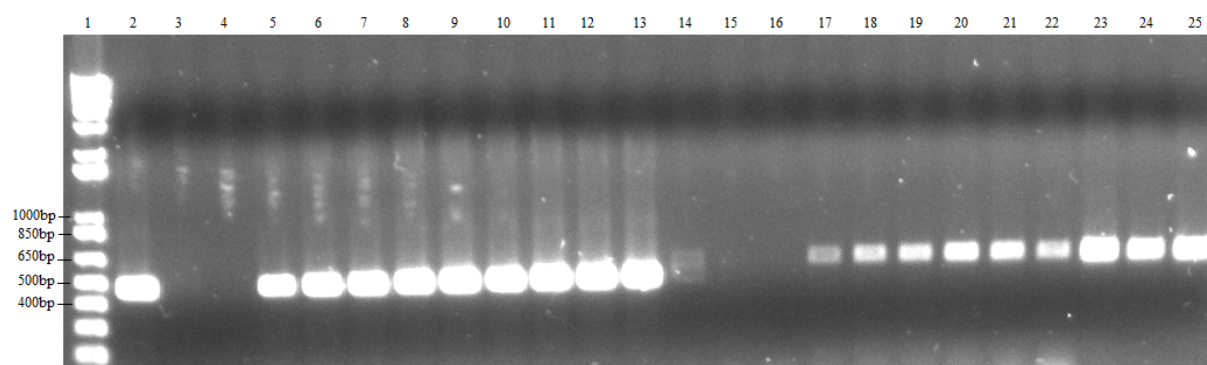
### 3.5 Sekvensering av *plcR*

*plcR* er et gen som koder for en positiv transkripsjonsregulator som oppregulerer en rekke ekstracellulære virulensfaktorer i organismene i *B. cereus*-gruppen, med unntak av *B. anthracis*, hvor alle kjente stammer har en spesifikk punktmutasjon i genet som gjør det ikke-funksjonelt. *plcR* ble sekvensert på utvalgte isolater for å undersøke hvorvidt disse stammene har en lignende punktmutasjon, eller eventuelt andre mutasjoner som kan inaktivere genet, og for å kartlegge fylogenetisk slektskap til *B. anthracis* med hensyn på dette genet.

Sekvensering av *plcR*-genet ble utført på FFIBCgr15, FFIBCgr20 og FFIBCgr121.

FFIBCgr15 og 20 ble valgt da disse isolatene tidligere hadde blitt brukt i PFGE-forsøket, og primerne som ble brukt til amplifisering av *plcR* hadde vist seg å hybridisere på disse isolatene, og FFIBCgr121 ble brukt da det har vist å inneha virulensgener assosiert med *B. anthracis*-plasmidene pXO1 og pXO2 (Hovland 2014), i tillegg til at isolatet ga positivt utslag for pXO1- og pXO2-lignende plasmider (se 3.3).

Sekvensering av *plcR* ble utført på urensset PCR-amplifisert DNA fra isolatene av Eurofins Genomics. To ulike primerpar ble brukt til sekvenseringen, som sekvenserte hver sin side av genet (Figur 5). PCR-produktenes størrelse ble bekreftet ved agarose gelelektroforese, for å bekrefte at PCR hadde amplifisert fragmenter i riktig størrelsesorden (~500 bp for primerparet *plcR*-4 og ~600 bp for primerparet *plcR*-7) (Figur 14). De to ferdige sekvensene for hvert isolat ble deretter satt sammen til én kontinuerlig sekvens med programmet MEGA6 (Tamura et al. 2013).



Figur 14.

Bilde fra 1 % agarose gelelektroforese etter endepunkts-PCR. 1) 1kb Plus Ladder størrelsesmarkør (Invitrogen), 2) Positiv kontroll (*B. anthracis* A31)+*plcR*-4, 3) Negativ kontroll (*Legionella pneumophila* serogruppe 1)+*plcR*-4, 4) Tom brønn+*plcR*-4, 5-7) FFIBCgr15+*plcR*-4, 8-10) FFIBCgr20+*plcR*-4, 11-13) FFIBCgr121+*plcR*-4, 14) Positiv kontroll (*B. anthracis* A31)+*plcR*-7, 15) Negativ kontroll (*Legionella pneumophila* serogruppe 1)+*plcR*-7, 16) Tom brønn+*plcR*-7, 17-19) FFIBCgr15+*plcR*-7, 20-22) FFIBCgr20+*plcR*-7, 23-25) FFIBCgr121+*plcR*-7



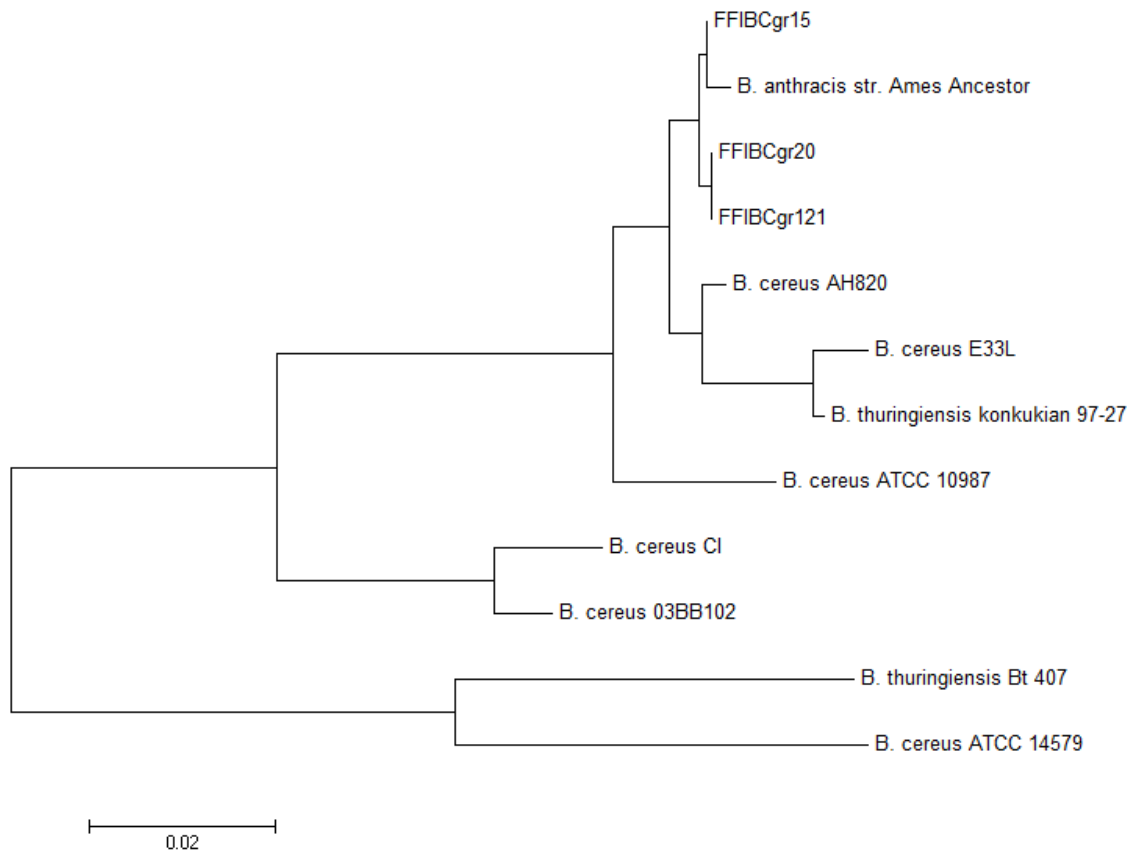
FFIBCgr20 og FFIBCgr121 viste seg å ha identisk *plcR*-sekvens, mens FFIBCgr15 skilte seg fra de to øvrige på kun to nukleotidsubstitusjoner, og ingen av disse substitusjonene fører til endringer i aminosyresammensetningen til PlcR-proteinet. Figur 15 viser de tre isolatene sammenlignet med *B. anthracis* str. Ames Ancestor, i regionen av *plcR*-genet hvor *B. anthracis* sin nonsensmutasjon som introduserer et prematurt TAA-stoppkodon befinner seg (se 1.3). Figuren viser også den samme regionen til stammene *B. cereus* ATCC 14579 og *B. cereus* ATCC 10987 (funksjonelt *plcR*-gen) og *B. cereus* CI (ikke-funksjonelt *plcR*-gen). Ingen av de tre sekvenserte isolatene hadde den aktuelle nonsensmutasjonen man finner i *B. anthracis*. Sammenlignet med hele gensekvensen til *B. anthracis* str. Ames Ancestor hadde FFIBCgr15 kun to nukleotidforskjeller (inkludert nonsensmutasjonen) og FFIBCgr20 og 121 fire nukleotidforskjeller (inkludert nonsensmutasjonen). De tre isolatene var fylogenetisk nærmere beslektet med *B. anthracis* med hensyn på *plcR* enn en rekke andre stammer fra *B. cereus*-gruppen, inkludert flere som er kjent for å være nære slektninger til *B. anthracis* basert på kromosomale MLST (Figur 16). Figur 17 viser en sammenligning av 3' ende av genot til de samme stammene, hvor man ser insersjonsmutasjonen som gir et rammeskift og fører til et modifisert C-terminus på PlcR-proteinet til stammen *B. cereus* CI (se 1.4.1). Ingen av de tre sekvenserte isolatene hadde en lignende mutasjon. Ingen av isolatene hadde andre mutasjoner, som insersjoner, deleasjoner eller substitusjoner, som ville bryte kodende sekvens i andre deler av genot.

1. FFIBCgr15	CTTGGACAATCAATACGAA	G AAGCGCTTTGTCATGC
2. FFIBCgr20	CTTGGACAATCAATACGAA	G AAGCGCTTTGTCATGC
3. FFIBCgr121	CTTGGACAATCAATACGAA	G AAGCGCTTTGTCATGC
4. <i>B. cereus</i> CI	CTCAGATAATCAATACGAA	G AAGCGCTTTGTCACGC
5. <i>B. cereus</i> ATCC 14579	TTTAGATAATCAATATGAA	G AGTCACTTTATCAAGT
6. <i>B. cereus</i> ATCC 10987	CTTGGACAATCAATACGAA	G AAGCACTTTGTCATGC
7. <i>B. anthracis</i> str. Ames Ancestor	CTTGGACAATCAATACGAA	T AAGCGCTTTGTCATGC

Figur 15.

Sammenligning av *plcR*-nukleotidsekvensen i isolatene FFIBCgr15, FFIBCgr20, FFIBCgr121, *B. cereus* CI, *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 10987 og *B. anthracis* str. Ames Ancestor, i området rundt nonsensmutasjonen til *B. anthracis*. Nonsensmutasjonen er uthevet i lyseblått. Programmet MEGA6 ble brukt til visualisering.





Figur 16.

Fylogenetisk slektskap i *plcR*-sekvensen mellom isolatene FFIBCGr15, 20 og 121 og et utvalg andre stammer fra *B. cereus*-gruppen, laget med «Neighbor Joining»-metoden (Saitou og Nei 1987). FFIBCGr15 var svært nært beslektet *B. anthracis* str. Ames Ancestor, med kun to nukleotiddifferanser. Alle tre isolater hadde mer likt *plcR* enn de øvrige stammene i treet, hvor flere av dem er nære naboer til *B. anthracis* basert på MLST-studier (Figur 1).

1. FFIBCGr15	TATAAAAAGAATGAAGAAATAA-----
2. FFIBCGr20	TATAAAAAGAATGAAGAAATAA-----
3. FFIBCGr121	TATAAAAAGAATGAAGAAATAA-----
4. <i>B. cereus</i> CI	TATA <span style="background-color: #e0f0ff;">AAAAAA</span> AATGAAGAAATAAAAAGGACCTAA
5. <i>B. cereus</i> ATCC 14579	CGTAAATAAAATCAGTAGATAA-----
6. <i>B. cereus</i> ATCC 10987	TATAAAAAGAATGAAGAAATAA-----
7. <i>B. anthracis</i> str. Ames Ancestor	TATAAAAAGAATGAAGAAATAA-----

Figur 17.

Sammenligning av 3' ende av *plcR*-genet i stammene FFIBCGr15, FFIBCGr20, FFIBCGr121, *B. cereus* CI, *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 10987 og *B. anthracis* str. Ames Ancestor. Inversjonsmutasjonen man finner hos *B. cereus* CI som gir modifisert C-terminus og forlenging av proteinet med fire aminosyrer (uthevet i lyseblått) inaktiverer proteinet (Klee et al. 2006a). MEGA6 ble brukt til visualisering.

## 4 Diskusjon

I dette arbeidet ble 147 *B. cereus*-gruppeisolater, isolert fra jord fra Etosha National Park (Namibia), screenet for fenotypiske og/eller genotypiske likhetstrekk til *B. anthracis*.

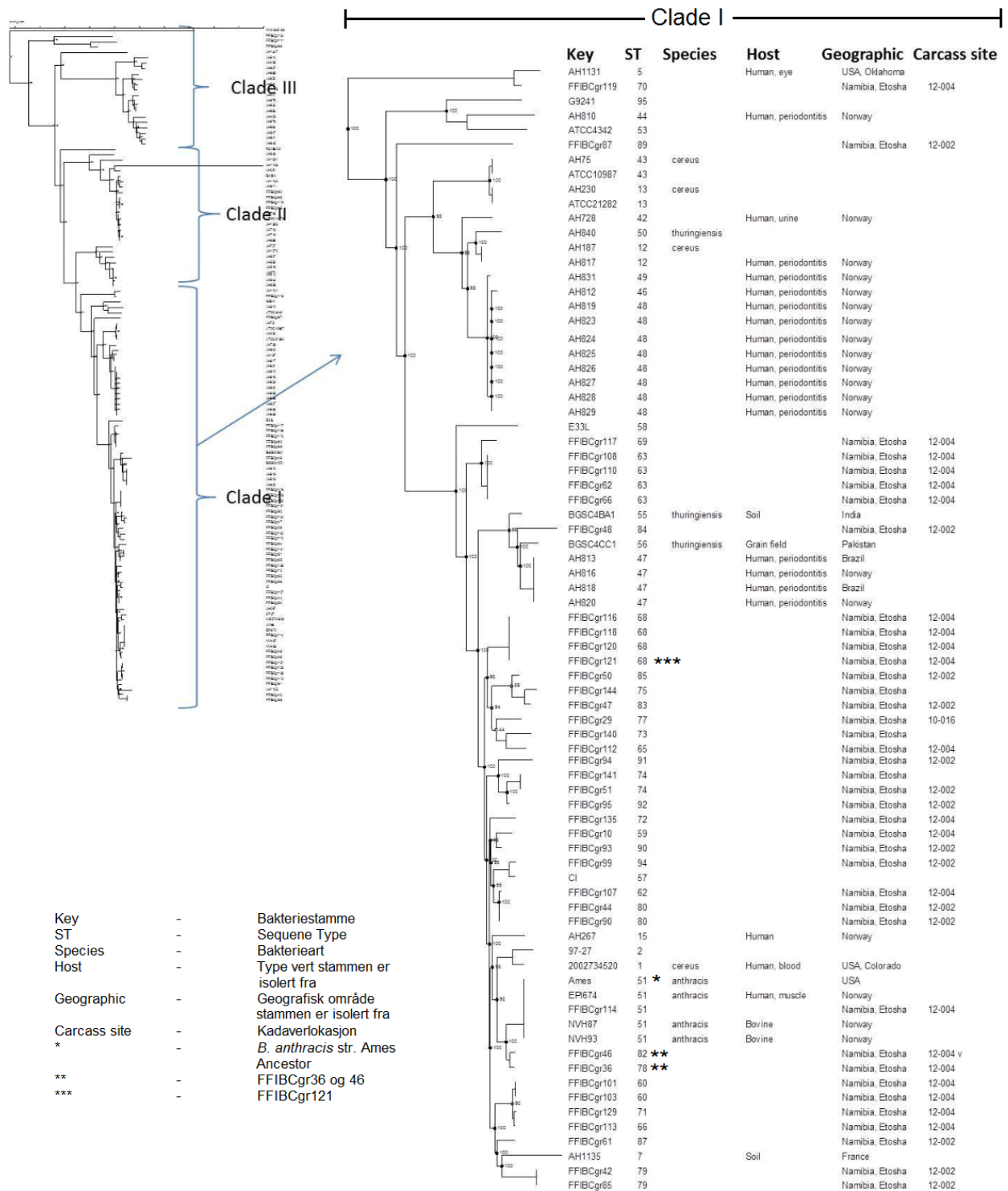
Jordprøvene ble tatt fra ulike avstander fra sebrakadaver som var døde som følge av miltbrannutbrudd (tabell 1). Målet med studien var å karakterisere disse isolatene for å, om mulig, identifisere nye *B. anthracis*-lignende varianter av *B. cereus*-gruppen.

MLST er tidligere utført på 46 av isolatene fra denne studien (Figur 18) (Hovland 2014). Av disse isolatene ble 39 av dem kartlagt å ligge i subgruppe I i *B. cereus*-gruppen (Clade I, se 1.2), den samme subgruppen *B. anthracis* befinner seg i.

### 4.1 Morfologisk og fenotypisk karakterisering

#### 4.1.1 Morfologi

I alt ble 85 isolater karakterisert på bakgrunn av koloni- og cellemorfologi. Av de 85 isolatene vokste 27 (~32 %) sammen i lange kjeder, ofte opp mot 30-40 celler sammen. Kjededannelse anses som et typisk kjennetegn ved cellemorfologien til *B. anthracis*, men det er kjent at *B. cereus* også kan ha denne egenskapen, så dette er et uegnet kriterium for definitivt identifisering av *B. anthracis* (Koehler 2009). Likevel er det interessant at en så stor andel av isolatene fra denne studien hadde denne egenskapen. Enkelte isolater hadde noen tilsynelatende ekstremt lange celler (10-30  $\mu\text{m}$ ), men det kan ha skyldtes at celleseptumet var vanskelig å se i mikroskopet, og at dette i realiteten var flere celler som vokste sammen. Blant isolatene som dannet kjeder, ble 21 observert å ha både firkantet og avrundet celletupp, hvor celletuppen til cellene i hver ende av kjedene hadde avrundet tupp, mens celletuppen i septumet mellom cellene var mer firkantete. Dette i motsetning de ikke-kjededannede isolatene som kun hadde avrundet tupp. Firkantet celletupp er vanlig å observere blant celler av *B. anthracis*, men ikke de øvrige medlemmene av *B. cereus*-gruppen (Koehler 2009). De kjededannende isolatene hadde generelt irregulære kolonier med undulat kant og hevet elevasjon, i motsetning til de øvrige isolatene, som generelt hadde sirkulære kolonier med hel kant og konveks elevasjon. Kjededannende isolater hadde dermed en kolonimorfologi som minnet mer om *B. anthracis*, som danner store kolonier med irregulær form, som ofte har høyere elevasjon enn øvrige medlemmer av *B. cereus*-gruppen (Balows et al. 1991).



Figur 18. Fylogenetisk tre produsert fra MLST-data fra 125 medlemmer fra *B. cereus*-gruppen, inkludert 46 isolater fra denne studien som er navngitt med prefikset «FFIBCgr». Clade I inneholder *B. anthracis*, samt flere nært beslektede stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis*. Clade II og III inneholder stammer fra *B. cereus* og *B. thuringiensis* fra en rekke ulike kilder, samt andre arter fra *B. cereus*-gruppen. *B. anthracis* str. Ames ancestor er merket med \*, isolatene FFIBCgr36 og 46 (som er svært nært beslektet med *B. anthracis*) er merket med \*\*, og isolatet FFIBCgr121 (som innehar pXO1- og pXO2-lignende plasmider med tilhørende virulensgener) er merket med \*\*\*. Mer detaljert informasjon om prøvelokasjon til isolatene fins i tabell 1, side 25. Hentet fra Hovland 2014.

Blant de kjededannende isolatene var imidlertid ingen kartlagt til fylogenetisk subgruppe I på bakgrunn av MLST (Hovland 2014), og var dermed ikke blant isolatene som var nærmest beslektet med *B. anthracis* basert på kromosomale markører (Figur 18), som gir ytterligere støtte til at kjededannelse ikke er noen unik egenskap for *B. anthracis*. Sett i lys av prøvelokasjonen til isolatene (tabell 1), er det spesielt isolatene fra prøvelokasjon 19C (jord fra 10 cm unna kadaversted) som utpeker seg, hvor 9 av 10 isolater var kjededannende.

#### 4.1.2 Hemolyse, motilitet og penicillinresistens

FFIBCgr1-85 var på forhånd testet for om de var hemolytiske på blod-agar (tabell 1). *B. anthracis*-stammer er vanligvis ikke hemolytiske, som følge av en nonsensmutasjon i *plcR*-genet (som er en positiv transkripsjonsregulator av ekstracellulære virulensfaktorer som fosfolipaser og hemolysiner) hos *B. anthracis* som gir et ikke-funksjonelt protein (se 1.3) (Agaisse et al. 1999), så fravær av hemolyse er et klart likhetstrekk til *B. anthracis*. Blant de 20 isolatene som var tidligere karakterisert som non-hemolytiske eller svakt hemolytiske, var 18 klassifisert som kjededannede isolater. De 9 resterende isolatene som dannet kjeder var hemolytiske. Kjededannelse var dermed ikke absolutt knyttet til fravær av hemolyse/senket hemolyseevne, men 18 isolater utviste altså hemolysemønstre, kolonimorfologi, veksttype og cellemorfologi med likhetstrekk til *B. anthracis*. Likevel var ingen av disse isolatene nært beslektet til *B. anthracis* basert på kromosomale markører (Figur 18), som er et slående eksempel på at fenotypiske egenskaper ikke følger en genbasert fylogeni, også i *B. cereus*-gruppen. Motilitet er et annet fenotypiske kriterium som tradisjonelt har blitt brukt for å skille *B. anthracis* fra andre medlemmer av *B. cereus*-gruppen (Turnbull et al. 1992), hvor *B. anthracis* er non-motil, mens *B. cereus* og *B. thuringiensis* generelt er motile. Men heller ikke dette kan gi noen definitiv klassifisering av artene, da det er kjent at det eksisterer stammer av *B. anthracis* som er motile – og omvendt for *B. cereus* og *B. thuringiensis* (Jensen et al. 2003). I alt ble 85 isolater screenet for evne til motilitet i den inneværende studien, og 25 av isolatene var non-motile under inspeksjon i mikroskop av celler i tidlig logaritmisk vekstfase. Samtlige av disse var blant de kjededannende isolatene. Videre var 18 av de non-motile isolatene også non-hemolytiske/svakt hemolytiske, og dannet kjeder. I alt 7 isolater dannet kjeder og var non-motile, men var i tillegg hemolytiske.

Penicillin-resistens som følge av betalaktamaseproduksjon er et kjent fenotypisk trekk som skiller *B. cereus* fra de betalaktamasenegative *B. anthracis* (Turnbull et al. 1992). Av de 85

isolatene ble testet for følsomhet for penicillin G, var kun tre av dem (FFIBCgr52, FFIBCgr82 og FFIBCgr84) penicillinfølsomme. FFIBCgr82 og FFIBCgr84 var begge svært like mhp kolonimorfologi, mens FFIBCgr52 skilte seg fra dem ved å danne mindre kolonier (2-3 mm i motsetning til 3-4 mm), som var sirkulære med hel kant, og var i så måte mindre *B. anthracis*-lignende enn de to øvrige penicillinfølsomme isolatene. FFIBCgr52 var i tillegg svakt hemolytisk, mens FFIBCgr82 og 84 begge var hemolytiske. Alle de penicillinfølsomme isolatene var isolert fra samme prøvelokasjon (tabell 1), så det er tenkelig at i hvert fall FFIBCgr82 og FFIBCgr84 (som begge var svært like mhp koloni- og cellemorfologi) representerer den samme stammen. Dette må imidlertid avgjøres av molekylære tilnæringsmetoder, da disse isolatene ikke var med i tidligere MLST-kartlegging av isolatene (Hovland 2014). Det er tidligere anslått at ca. 95 % av alle stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* er motile og/eller penicillinresistente (Vilas-Boas et al. 2007). Omtrent 3,5 % av alle de testede isolatene i denne studien var penicillinfølsomme, mens omtrent 29 % av isolatene var non-motile og var dermed noe overrepresentert.

### **4.1.3 Identifisering av isolater som *B. thuringiensis***

Under sporulering vil eventuelle isolater av arten *B. thuringiensis* produsere store krystallproteininkludjoner i morcellen, som kan observeres i mikroskop (Kim et al. 2004). Blant isolatene i denne studien ble det kun påvist krystalltoksin i FFIBCgr76, som ble identifisert som en mulig *B. thuringiensis*-stamme. *B. thuringiensis* kan imidlertid spontant miste krystalltoksinplasmider, eksempelvis ved dyrking ved høyere temperaturer, og vi kan derfor ikke utelukke at flere isolater fra stammekolleksjonen kan ha vært *B. thuringiensis* som har tapt plasmidet under isolasjon, lagring eller lignende. Dette vil i praksis gjør det umulig å skille dem fra *B. cereus* (Økstad og Kolstø 2011), selv om ingen deler av prosedyren tilsier at dette skal ha funnet sted.

## **4.2 Plasmider**

### **4.2.1 pXO1- og pXO2-lignende plasmider**

Virulensplasmidene pXO1 og pXO2 koder for henholdsvis miltbrann-toksinene og poly- $\gamma$ -D-glutaminsyre kapselen til *B. anthracis*, og begge plasmidene er nødvendig for full virulens (Mock og Fouet 2001). En rekke store plasmider er identifisert blant isolater fra *B. cereus*-

gruppen, med stor grad av sekvenslikhet og andel felles gener med pXO1 og pXO2. Disse pXO1- og pXO2-lignende plasmidene deler flere konserverte kjerneregioner med henholdsvis pXO1 og pXO2 – en såkalt konservert ryggrad (se 1.6.1) (Rasko et al. 2007, Van der Auwera et al. 2005). Eksempler på pXO1-lignende plasmider inkluderer pBCX01 fra *B. cereus* G9241 som inneholder et komplett sett med miltbranntoksingener, plasmidet pCER270 som inneholder genclusteret *ces* som koder for det emetiske toksinet cereulid i emetiske *B. cereus*-stammer, og plasmidet pPER272 som er isolert fra *B. cereus*-stammer funnet i tannkjøttlommen hos pasienter med periodontitt (Hoffmaster et al. 2004, Rasko et al. 2007). Det pXO1-lignende plasmidet pBC10987 er dessuten isolert fra *B. cereus* ATCC 10987 (isolert fra ost i Canada i 1930) (Rasko et al. 2007). Tilsvarende er de pXO2-lignende plasmidene pAW36 og pBT9727 isolert fra henholdsvis *B. thuringiensis* kurstaki HD73, som brukes i insektmidler, og *B. thuringiensis* konkukian 97-27, som er isolert fra et tilfelle av alvorlig human vevsnekrose (Van der Auwera et al. 2008). Begge plasmidene er konjugative, og mangler patogenisitetøyen med kapselgenene til *B. anthracis* (Pannucci et al. 2002a, Van der Auwera et al. 2005, Van der Auwera og Mahillon 2008).

Samtlige isolater i denne studien ble screenet for tilstedeværelse av pXO1- og pXO2-lignende plasmider ved hjelp av Real Time PCR og primere som er kjent å amplifisere gener i den konserverte ryggraden i disse plasmidene. Markørene *repX* og pXO1-58 amplifiserte henholdsvis et gen som koder for et protein involvert i plasmidreplikasjon og vedlikehold, og et gen som koder for et hypotetisk protein i pXO1-lignende plasmider (Rasko et al. 2007). Markøren *repA* amplifiserte et gen som koder for et protein som er involvert i replikasjonen av pXO2-lignende plasmider (Bahl og Rosenberg 2010). I denne studien var totalt 22 isolater positive for *repX*, 52 var positive for pXO1-58 og 13 var positive for *repA*. Det var forventet at begge markørene for de pXO1-lignende plasmidene (*repX* og pXO1-58) skulle være positive i de samme isolatene. Det var imidlertid stor variasjon i hvilke isolater som var positive for markørene, og kun 13 isolater var positive for begge markørene (tabell 6). Både *repX*- og pXO1-58-primerparene er tidligere publiserte (Rasko et al. 2007, Bahl og Rosenberg 2010) og foreslått som markører for pXO1-lignende plasmider, så det at de ikke ga identisk amplifiseringsmønster kan skyldes at det fins varianter av pXO1-lignende plasmider som kan tenkes å ikke ha pXO1-58-genet, eventuelt at det fins varianter av disse genene som tilfeldigvis bærer mutasjoner i primerbindingssetet som hindrer at primerne kan hybridisere. Vi kan aldri stole fullstendig på et negativt resultat i PCR, og dette viser fordelene med å kunne

screenene med mer enn én markør. Vi valgte å definere et isolat som å inneholde pXO1-lignende plasmid dersom én av de to markørene var positive, som gjaldt i alt 61 isolater.

Det er gjort flere studier hvor store mengder med stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* er screenet for tilstedeværelsen av pXO1- og pXO2-lignende plasmider. Funnene fra disse studiene har vist at pXO1- og pXO2-lignende plasmider er vanlig blant disse artene, spesielt blant *B. cereus*-gruppestammer isolert fra jord, og trenger ikke være relatert til virulens eller fylogenetisk slektskap i *B. cereus*-gruppen (Hu et al. 2009a, Hu et al. 2009b, Bahl og Rosenberg 2010). Slik screening har vist at pXO1-lignende plasmider er vanligere enn pXO2-lignende plasmider, som samsvarer med resultatene fra denne studien, hvor 13 isolater var positive for pXO2-lignende plasmider, og totalt 61 isolater var positive for pXO1-lignende plasmider. Det er også kjent at *B. anthracis* spontant kan miste pXO2 i langt større grad enn pXO1 (Edwards et al. 2006), og det kan tenkes at dette også gjelder for pXO2-lignende plasmider. Det faktum at flere pXO2-lignende plasmider er konjugative kan videre bidra til å spre slike genetiske elementer blant samfunn av *B. cereus* og *B. thuringiensis* i miljøet, og det er oppdaget pXO2-lignende plasmider i artene *B. mycooides* og *B. pseudomycooides*, som tyder på at det foregår plasmidoverføring mellom artene i *B. cereus*-gruppen (Hu et al. 2009a). Om potensielle pXO2-lignende plasmider kan ha lignende funksjon i isolatene i inneværende studie er ikke kjent, og ville kreve funksjonelle studier.

*B. anthracis* er kjent for å danne seige/slimete kolonier som følge av kapseldannelse, en egenskap som er kodet for av gener på pXO2-plasmidet (Koehler 2009). Isolatene FFIBCgr52, FFIBCgr54 og FFIBCgr85 hadde alle påfallende slimete kolonier etter vekst i 24 timer på TSA-medium. Ingen av de ovennevnte isolatene var imidlertid positive for pXO2-lignende plasmider ut fra PCR-analyser for markøren *repA*, og FFIBCgr85 var vist å være negativ for kapselgenet *capB* i en tidligere screening (Hovland 2014). Om disse isolatene kan danne kapsel ved bruk av andre gener, eksempelvis kodet på et plasmid av en annen plasmid-familie, kan vi ut fra nåværende tilgjengelige isolater resultater ikke si noe om. Det er imidlertid kjent at stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* kan danne polysakkarid- eller poly- $\gamma$ -D-glutaminsyre-kapsel fra gener båret på andre typer plasmider (Hoffmaster et al. 2004, Cachat et al, 2008).

### 4.2.2 PFGE

PFGE ble utført på åtte isolater som var positive for én eller flere av markørene for pXO1- eller pXO2-lignende plasmider. Kun to av isolatene ga positiv bekreftelse på nærvær av store plasmider: FFIBCgr15 (positiv for *repX* og pXO1-58) og FFIBCgr20 (positiv for pXO1-58). FFIBCgr15 ble vist å ha ett plasmid på omtrent 400kb, og FFIBCgr20 hadde tre plasmider på omtrent 300, 450 og 600 kb. Det er ikke dermed sagt at de resterende isolatene som ikke ga positive resultater under PFGE ikke har plasmider. De fraværende positive resultatene kan komme av manglende lysing av bakteriecellene i gelpluggene. Siden FFIBCgr20 hadde tre plasmider i ulike størrelser vet vi ikke hvilke(t) av dem som ga utslag under PCR-screeningen for pXO1-lignende plasmider. pXO1-lignende plasmider kan variere i størrelse fra 15-600 kb, og er dermed ofte større enn pXO1 (181 kb) (Helgason et al. 2000a). Resultatene fra denne studien er ytterligere eksempler på dette.

### 4.3 *plcR*

PlcR er en pleiotrop positiv transkripsjonsregulator som kodes for av *plcR*, et gen som fins på kromosomet til alle organismene i *B. cereus*-gruppen. PlcR inngår sammen med peptidet PapR i et quorum-sensing-system, og oppregulerer uttrykk av en rekke ekstracellulære virulensfaktorer, inkludert kollagenase, fosfolipaser, hemolysiner, proteaser og enterotoksiner (Gohar et al. 2002, Slamti et al. 2004). *B. anthracis* skiller seg fra de øvrige medlemmene av *B. cereus*-gruppen ved at samtlige undersøkte stammer av arten har en nonsensmutasjon i *plcR*-genet, som introduserer et prematurt stoppkodon og gir et trunkert, nonfunksjonelt protein (Agaisse et al. 1999). *B. cereus* og *B. thuringiensis* har derimot begge funksjonelt *plcR* (Agaisse et al. 1999). Ved å sette inn et funksjonelt *plcR*-gen i *B. anthracis* vil uttrykk av flere klassiske virulensfaktorer som reguleres av PlcR i *B. cereus* detekteres (Mignot et al. 2001, Pomerantsev et al. 2004), noe som viser at disse genene er til stede og intakte også i *B. anthracis*, men at de vanligvis uttrykkes i svært liten eller ingen grad. Sekvensering av *plcR* i en rekke *B. cereus*- og *B. thuringiensis*-stammer som har mistet noen klassiske PlcR-assosierte fenotypiske trekk som hemolyse og lektinase-aktivitet, har vist at dette ofte skyldes at de har oppnådd mutasjoner i *plcR* eller *papR* som inaktiverer regulonet. Det er anslått at omtrent 1 % av alle non-*B. anthracis*-stammer fra *B. cereus*-gruppen har et inaktivt *plcR*-basert quorum sensing-system (Slamti et al. 2004). Så langt har man imidlertid ikke identifisert den samme klassiske nonsens-mutasjonen man finner i alle *B. anthracis*-stammer i



noen slike non-*B. anthracis*-stammer med inaktivt *plcR* (Slamti et al. 2004). Det er foreslått at mutasjonen i *plcR* i *B. anthracis* er tilegnet som følge av en inkompatibilitet mellom *plcR* og pXO1-virulensregulatoren *atxA*, som fører til at bakteriene ikke kan sporulere (Mignot et al. 2001). Dette er senere blitt tilbakevist, og en ny hypotese har blitt fremlagt som foreslår at mutasjonen skyldes at mange av de PlcR-regulerte proteinene, som proteaser og fosfolipaser, er toksiske mot makrofager, og derfor er *plcR* inaktivert i *B. anthracis*, siden den er avhengig av makrofager for å være virulent i pattedyr (Sastalla et al. 2010).

I denne studien ble *plcR* sekvensert for tre isolater: FFIBCgr15, FFIBCgr20 og FFIBCgr121. Den opprinnelige intensjonen var å sekvensere *plcR*-sekvensen til samtlige isolater som var non-hemolytiske eller svakt hemolytiske, da dette kunne tyde på at *plcR* ikke er funksjonell i disse isolatene. Det er kjent at *plcR* er et av de mest variable genene innenfor *B. cereus*-gruppen (Ko et al. 2004), og på grunn av vanskeligheter med å finne primere som amplifiserte genet under PCR, ble det for liten tid til å gjennomføre det planlagte sekvenseringsarbeidet. Både tidligere publiserte primere (Slamti et al. 2004), og en rekke egendesignete primere ble forsøkt brukt (vedlegg 1) – uten å gi ønsket amplifisering, heller ikke i positiv kontroll (*B. anthracis*). Et stort problem var å finne primere som hybridiserte til regioner i *plcR* som var konserverte på tvers av ulike stammer, som ikke er noe uvanlig problem for bakteriearter med så høyt AT-innhold (~65 %) (Ivanova et al. 2003) som man finner i *B. cereus*-gruppen.

Et mindre antall isolater ble imidlertid PCR-amplifisert og sekvensert, og *plcR*-regionen til to av isolatene (FFIBCgr20 og FFIBCgr121) viste seg å være identisk, mens FFIBCgr15 kun skilte seg fra de to øvrige på kun to nuklotidsubstitusjoner, som ikke resulterte i endringer i aminosyresekvensen til PlcR-proteinet. FFIBCgr121 var spesielt interessant, da det fra MLST-kartlegging var vist å ligge i subgruppe I (Figur 18), men utenfor *B. anthracis*-clusteret. Videre var isolatet tidligere vist å være positiv for genene *pagA* og *lef* (som begge er miltbranntoksingener fra pXO1), to ulike regioner av genet *cabB* (kapselgen fra pXO2) (Hovland 2004), samt at isolatet var positiv for pXO1- og pXO2-lignende plasmider. *plcR* fra de tre isolatene ble sammenlignet med sekvensen til *B. anthracis* i det området hvor nonsens-mutasjonen befinner seg (Figur 15) og ingen av isolatene hadde en lignende mutasjon. De hadde heller ingen andre mutasjoner som antydte redusert/ikke-funksjonell *plcR*. *plcR*-sekvensen til isolatene ble òg sammenlignet med den samme sekvensen til stammen *B. cereus* CI, som har ikke-funksjonell *plcR* som skyldes en annen mutasjon enn den man finner i *B. anthracis*, en insersjonsmutasjon i 3' ende av genet som gir et rammeskift, og

et protein som er forlenget med fire aminosyrer (Klee et al. 2006a) (Figur 17), og dermed antas å ikke lenger kunne interagere med sitt PapR quorum sensing-peptid. Ingen av de ovennevnte isolatene hadde en lignende mutasjon heller. *plcR*-sekvensen til de tre isolatene ble imidlertid vist å være svært likt *B. anthracis* sitt *plcR*, også sammenlignet med flere andre stammer fra *B. cereus*-gruppen som ellers er kjent for å være nært beslektet med *B. anthracis* basert på andre kromosomale markører (Figur 16). FFIBCgr15 og FFIBCgr20 var forventet å ha funksjonell *plcR*, da begge isolatene hadde vist seg å være hemolytiske.

Hemolyseresultater for FFIBCgr121 er dessverre i skrivende stund fraværende, men isolatet har identisk *plcR*-sekvens som FFIBCgr20 som også synes å ha funksjonell *plcR*, både ut fra sekvenserings- og hemolysedata.

## 4.4 Samlede resultater

Det er vist at *B. cereus*-isolater som er genetisk nært beslektet med *B. anthracis* ikke nødvendigvis deler fenotypiske likhetstrekk, som non-motilitet og penicillinfølsomhet (Olsen et al. 2007). Vi kan dermed ikke konkludere utvetydig vedrørende de studerte isolatenes slektskap til *B. anthracis* kun basert på de fenotypiske analysene. For å underbygge dette var stammene *B. cereus* CI og CA (Leendertz et al. 2004), som er kjent for å ha forårsaket tilfeller av miltbrann-lignende sykdom i aper, motile, og noen av isolatene fra de døde apene var penicillinfølsomme (Klee et al. 2010). Så selv om en stamme av *B. cereus* deler virulensegenskaper med *B. anthracis*, trenger de ikke nødvendigvis dele *B. anthracis* sine klassiske fenotypiske trekk. Fra de fenotypiske og morfologiske analysene av isolatene i inneværende studie var det en klar sammenheng mellom de *B. anthracis*-lignende trekkene. Med unntak av penicillin-følsomhet syntes disse trekkene å være til stede i en «pakke», som innebar dannelsen av lange kjeder, store irregulære kolonier, non-motilitet og mangel på hemolyse. Disse isolatene var i så måte svært like *B. anthracis*. MLST av 46 isolater fra denne studien har vist at 39 av dem er lokalisert i subgruppe I i *B. cereus*-gruppen, den samme gruppen *B. anthracis* befinner seg i. Blant disse 39 isolatene var 14 karakterisert på bakgrunn av morfologiske og fenotypiske likhetstrekk til *B. anthracis* (koloni- og cellemorfologi, samt motilitet og penicillinfølsomhet), men ingen av disse isolatene var verken kjededannende eller non-motile (Figur 18). Kjededannende og non-motile isolater var derimot utelukkende mappet til subgruppe II eller III (Hovland 2014), noe som ytterligere

befester at det ikke trenger være noen sammenheng mellom fylogenetisk slektskap basert på genetisk kartlegging og andre likhetstrekk for øvrig.

Isolatene FFIBCgr36 og 46 er vist å være svært nært beslektet med *B. anthracis*, basert på kromosomal MLST (Figur 18) (Hovland 2014), og kan faktisk være de nærmest kjente naboene til *B. anthracis* som er observert så langt. Likevel hadde ingen av disse isolatene andre *B. anthracis*-lignende trekk, da de begge var motile, penicillinresistente og vokste ikke sammen i kjeder. Begge isolatene var negative for alle markører for pXO1- og pXO2-lignende plasmider. MLST av isolatet FFIBCgr114 har dessuten vist at dette isolatet er identisk med *B. anthracis* (Figur 18). Videre er isolatet bekreftet å inneha de pXO1- og pXO2-assosierte virulensgenene *pagA*, *lef* og *capB* (Hovland 2014). Alt dette tyder på at dette isolatet er *B. anthracis*, som feilaktig har blitt en del av studien. Dette ble ytterligere bekreftet ved screeningen for pXO1- og pXO2-lignende plasmider, hvor isolatet var positive for alle tre markører.

Isolatet FFIBCgr121 har tidligere vist seg å være positiv for klassiske *B. anthracis*-virulensgener som er lokalisert på pXO1 og pXO2, ved å være positiv for genene *pagA* og *lef* (gener som koder for miltbranntoksin på pXO1) og for to ulike regioner av genet *capB*, som er del av kapseloperonet på pXO2 (Hovland 2014). Isolatet var i tillegg positiv for alle tre markører for pXO1- og pXO2-lignende plasmider (tabell 6). Dette tyder på at isolatet innehar enten faktiske pXO1- og pXO2-plasmider, eventuelt plasmider med stor grad av sekvenslikhet, inkludert virulensgenene. Resultatene i den inneværende studien kan indikere at dette isolatet representerer en stamme av *B. cereus*/*B. thuringiensis* som har tilegnet seg virulensplasmidene via horisontal genoverføring fra *B. anthracis* i miljøet, selv om dette aldri har blitt dokumentert forekommet (Klee et al. 2006a). Det er imidlertid dokumentert at det er mulig å mobilisere overføring av pXO1 og pXO2 ved hjelp av de konjugative plasmidene pXO12 og pXO14 fra *B. thuringiensis* (Reddy et al. 1987). Isolatet ble isolert fra næringsjord ved kadaversted (tabell 1), og dermed uten noen indikasjon på at dette isolatet har vært involvert i patogenese i dyret eller i direkte kontakt med en *B. anthracis*-stamme som forårsaket sykdom i dyret. Ut fra tilgjengelig informasjon om isolatet og prøvetaking, kan vi imidlertid heller ikke utelukke at FFIBCgr121 har vært årsak til utbruddet og sykdom hos det døde sebra-individet.

FFIBCgr121 representerer dermed et svært interessant isolat. Det kunne tenkes at dette faktisk er et *B. anthracis*-isolat som feilaktig har blitt med i studien. MLST har imidlertid vist at

isolatet er lokalisert i subgruppe I (clade I) i *B. cereus*-gruppen, men at det er fjernere beslektet med *B. anthracis* enn blant annet *B. cereus* CI basert på kromosomale markører (Figur 18) (Hovland 2014). I tillegg har isolatet ikke den klassiske *B. anthracis*-mutasjonen i *plcR*. Likevel er det interessant at isolatet har et *plcR*-gen som er nærmere beslektet med *B. anthracis* sitt *plcR* enn *B. cereus* CI sitt *plcR* (Figur 16). Dette gjør at isolatet ikke kvalifiserer til *B. anthracis* basert på to av tre tidligere foreslåtte kriterier for at en art skal klassifiseres som *B. anthracis* (Kolstø et al. 2009). Vi kan derfor ikke utelukke at dette isolatet utgjør det første beskrevne tilfellet av et medlem av *B. cereus*-gruppen som har *B. anthracis*-virulensplasmidene pXO1, pXO2 og samtidig et funksjonelt *plcR*-gen kodet på et *B. cereus*-kromosom. Videre er det mulig at FFIBCgr121 representerer det første miljøisolatet av et medlem fra *B. cereus*-gruppen som er i stand til å forårsake miltbrann-lignende sykdom – alle tidligere beskrevne isolater av denne typen er isolert fra kliniske tilfeller. Dette isolatet kan derfor tenkes å kunne tjene som utgangspunkt for videre kartlegging av interaksjoner mellom kromosom og plasmid i *B. cereus*-gruppen, og i undersøkelser av stabilitet av *B. anthracis*-plasmider i hva som tyder å være en *B. cereus*-kromosomale bakgrunn. Det at isolatet inneholder både pXO1- og pXO2-lignende plasmider med tilhørende virulensgener for miltbranntoksin og kapsel, samt tilsynelatende intakt *plcR* kan også gi ytterligere støtte til at det ikke trenger være noen inkompatibilitet mellom virulensregulatoren *atxA* og funksjonell *plcR*.

## 4.5 Videre arbeid

Det er foreløpig et stort gap mellom hvilke av isolatene som er brukt i MLST-kartlegging av kromosomalt slektskap (Hovland 2014), og hvilke isolater som er karakterisert på bakgrunn av morfologiske og fenotypiske likhetstrekk til *B. anthracis* (denne studien). For å få et mer komplett bilde over isolatene i denne studien bør MLST utføres på alle isolater som ble utelatt da MLST ble gjennomført tidligere. Karakterisering av koloni- og celled morfologi, samt testing for hemolyse, motilitet og penicillinfølsomhet bør utføres på isolatene som ble utelatt fra inneværende studie (FFIBCgr86-147), for å undersøke om eventuelt disse isolatene har *B. anthracis*-lignende karakteristikk. Nå som vi vet at vi har primerpar som er i stand til å amplifisere og sekvensere *plcR* bør dette utføres på alle de non-hemolytiske/svakt hemolytiske isolatene, for å undersøke om de har den samme mutasjonen som *B. anthracis* i dette genet som fører til den reduserte/fraværende hemolyseaktiviteten i *B. anthracis*. Dette

kan også brukes til å undersøke om disse isolatene har like stor grad av sekvenslikhet til *B. anthracis plcR* som de tre sekvenserte isolatene i denne studien. *plcR* bør òg sekvenseres fra isolatene FFIBCgr36 og 46, for å kunne utelukke at disse isolatene er *B. anthracis*, og *plcR* bør sekvenseres på FFIBCgr114 for endelig bekreftelse på at dette isolatet er *B. anthracis*.

Blant de klassiske fenotypiske trekkene som benyttes for å skille *B. anthracis* fra *B. cereus/B. thuringiensis* er følsomhet for gammabakteriofag. Med bare noen få spesielle unntak er alle kjente *B. anthracis*-stammer følsomme for denne fagen (Abshire et al. 2005). Likeledes er også bare et lite antall kjente tilfeller av *B. cereus*-stammer følsomme for viruset (Abshire et al. 2005). Testing for gammafagfølsomhet er dermed et fenotypisk trekk som er vist å være en svært robust måte å skille *B. anthracis* fra *B. cereus/thuringiensis* (Klee et al. 2006b). Det ville derfor vært interessant å screene isolatene i denne studien for gammafagfølsomhet. På grunn av vanskeligheter med anskaffelse av fagen ble dette ikke gjennomført innenfor rammene av inneværende studie.

Isolatet FFIBCgr121 bør studeres videre. Isolatet bør helgenomsekvenseres, og fylogenetisk slektskap til virulensplasmidene pXO1 og pXO2 bør kartlegges. Helgenomsekvensering vil også gi svar på eventuell tilstedeværelse av *B. anthracis*-profagene Lambda01-04, som kan gi ytterligere bekreftelse på at isolatet ikke er *B. anthracis* (Kolstø et al. 2009). Det kan være nødvendig med dyreforsøk for å undersøke om isolatet uttrykker virulensgenene assosiert med disse plasmidene. Koloni- og cellemorfologisk karakterisering, samt testing for hemolyse motilitet og penicillinfølsomhet bør utføres på isolatet, for å, om mulig, identifisere ytterligere likhetstrekk til *B. anthracis*. *papR*-genet til isolatet bør analyseres for å få endelig bekreftelse på at isolatet har funksjonelt PlcR-PapR quorum sensing-system. Det sistnevnte kan komplementeres ved å analysere isolatets sekretom med 2D proteingelelektroforese eller LC-MS/MS-analyser.

## 5 Konklusjon

I denne studien har 85 av 147 bakterieisolater av *B. cereus*-gruppen, isolert fra Etosha National Park (Namibia), blitt undersøkt for morfologiske og fenotypiske likhetstrekk til miltbrannbakterien *B. anthracis*. En stor andel av de studerte isolatene hadde ett eller flere *B. anthracis*-lignende trekk, men disse likhetstrekkene korrelerte ikke nødvendigvis med fylogenetisk slektskap til *B. anthracis*, noe som stemmer overens med tidligere studier. Eksempelvis hadde isolatene FFIBCgr36 og FFIBCgr46, som begge er svært nært beslektet med *B. anthracis* basert på kromosomal MLST, ingen ytterligere likhetstrekk til *B. anthracis*.

Isolatet FFIBCgr121 kan representere det første beskrevne isolatet av et medlem fra *B. cereus*-gruppen som innehar pXO1- og pXO2-lignende plasmider, med tilhørende virulensgener for henholdsvis miltbranntoksin og kapsel, i kombinasjon med intakt *plcR*-gen. Dette kan gi ytterligere støtte til at det ikke er noen inkompatibilitet mellom pXO1-virulensregulatoren *atxA* og funksjonell *plcR*. Vi kan ut fra eksisterende data ikke utelukke at dette isolatet er en *B. cereus*-stamme som har tilegnet seg pXO1 og pXO2 ved horisontal genoverføring.

## 6 Vedlegg

### 6.1 Vedlegg 1: Primerpar forsøkt brukt til sekvensering av *plcR*

Primer	Sekvens	Forventet fragmentstørrelse	Kilde
S1 *	CTATTATTATATGTGAGATGAATTGTATG	*	Slamti et al, 2004
S2 *	GTAAAGACGTTTGGATGTACTCC	*	Slamti et al, 2004
S3 *	CGCAATTGCAAACATTTATGCTGA	*	Slamti et al, 2004
S4 *	CATTATCATGCAATGCCTCTAATTGT	*	Slamti et al, 2004
BAS1 *	CTATTATTGTATGTGGATGAATTGTATG	*	Denne studien
BAS3 *	CGCAATTGCAAACATTTACGCTGA	*	Denne studien
BAS4 *	TATTATCATGTAATACTTCTAATTGC	*	Denne studien
<i>plcR</i> -F1	TTTCATATTCCATCACCCGCA	962 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R1	GGTGAGTAAGTATGCACGCA		
<i>plcR</i> -F2	TCATATTCCATCACCCGATTT	966 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R2	TGGGATGGTGAGTAAGTATGCA		
<i>plcR</i> -F3	CCTAATGAAATACCCCATGCCA	1017 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R3	GTGAGTAAGTATGCACGCAGAA		
<i>plcR</i> -F3	CCTAATGAAATACCCCATGCCA	1018 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R1	GGTGAGTAAGTATGCACGCA		
<i>plcR</i> -F5	TGGGATGGTGAGTAAGTATGCA	616 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R5	TGICTCACCTTCACATCAAAYTC		
<i>plcR</i> -F6	TGGCAATATCATGTRGCTGC	605 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R6	TTTCATATTCCATCACCCRCA		
<i>plcR</i> -F4	GGTGAGTAAGTATGCACGCA	962 bp	Denne studien
<i>plcR</i> -R7	TCATATTCCATCACCCRCATT		
<b>* Primerne ble brukt i følgende kombinasjoner:</b>	<b>Forventet fragmentstørrelse:</b>		
S1+S2	1306 bp		
S1+S4	725 bp		
S2+S3	678 bp		
BAS1+S2	1306 bp		
BAS1+BAS4	725 bp		
S2+BAS3	678 bp		





# Litteraturliste

- Abshire, T. G. Brown, J. E. and Ezzell, J. W. (2005). "Production and validation of the use of gamma phage for identification of *Bacillus anthracis*." Journal of Clinical Microbiology **43**(9): 4780-4788.
- Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Okstad, A. B. Kolsto and D. Lereclus (1999). "PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*." Molecular Microbiology **32**(5): 1043-1053.
- Agata, N., M. Ohta and M. Mori (1996). "Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*." Current Microbiology **33**(1): 67-69.
- Apetroaie, C., M. A. Andersson, C. Sproer, I. Tsitko, R. Shaheen, E. L. Jaaskelainen, L. M. Wijnands, R. Heikkila and M. S. Salkinoja-Salonen (2005). "Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity." Archives of Microbiology **184**(3): 141-151.
- Arnesen, L. P. S., A. Fagerlund and P. E. Granum (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." Fems Microbiology Reviews **32**(4): 579-606.
- Ash, C. and M. D. Collins (1992). "Comparative-Analysis of 23s-Ribosomal Rna Gene-Sequences of *Bacillus-Anthraxis* and Emetic *Bacillus-Cereus* Determined by Pcr-Direct Sequencing." Fems Microbiology Letters **94**(1-2): 75-80.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt and M. D. Collins (1991). "Comparative-Analysis of *Bacillus-Anthraxis*, *Bacillus-Cereus*, and Related Species on the Basis of Reverse-Transcriptase Sequencing of 16s Ribosomal-Rna." International Journal of Systematic Bacteriology **41**(3): 343-346.
- Avashia, S. B., W. S. Riggins, C. Lindley, A. Hoffmaster, R. Drumgoole, T. Nekomoto, P. J. Jackson, K. K. Hill, K. Williams, L. Lehman, M. C. Libal, P. P. Wilkins, J. Alexander, A. Tvaryanas and T. Betz (2007). "Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes." Clinical Infectious Diseases **44**(3): 414-416.
- Bahl, M. I. and K. Rosenberg (2010). "High abundance and diversity of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1-like replicons in municipal wastewater." Fems Microbiology Ecology **74**(1): 241-247.

- Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer, Eds. (1991). The Prokaryotes; a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification. New York, Springer-Verlag.
- Beatty, M. E., D. A. Ashford, P. M. Griffin, R. V. Tauxe and J. Sobel (2003). "Gastrointestinal anthrax - Review of the literature." Archives of Internal Medicine **163**(20): 2527-2531.
- Bhandari, V., Ahmod, N. Z., Shah, H. N. and Gupta, R. S. (2013). "Molecular signatures for Bacillus species: demarcation of the Bacillus subtilis and Bacillus cereus clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus Bacillus." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **63**: 2712-2726.
- Bikandi, J., R. San Millán, A. Rementeria and J. Garaizar. (2004). "In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction." Bioinformatics **20**. from <http://insilico.ehu.es/PCR/>.
- Bottone, E. J. (2013). "Bacillus cereus, a volatile human pathogen." Clin Microbiol Rev **23** (2): 382-398.
- Bowen, J. E. and C. P. Quinn (1999). "The native virulence plasmid combination affects the segregational stability of a theta-replicating shuttle vector in Bacillus anthracis var. New Hampshire." Journal of Applied Microbiology **87**(2): 270-278.
- Brachman, P. S. (1970). "Anthrax." Annals of the New York Academy of Sciences **174**(2): 577-&.
- Brachman, P. S. (1980). "Inhalation anthrax." Ann N Y Acad Sci **353**: 83-93.
- Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberon (2007). "Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." Toxicon **49**(4): 423-435.
- Brillard, J. and D. Lereclus (2004). "Comparison of cytotoxin cytK promoters from Bacillus cereus strain ATCC 14579 and from a B-cereus food-poisoning strain." Microbiology-Sgm **150**: 2699-2705.
- Cachat, E., M. Barker, T. D. Read and F. G. Priest (2008). "A Bacillus thuringiensis strain producing a polyglutamate capsule resembling that of Bacillus anthracis." Fems Microbiology Letters **285**(2): 220-226.
- Carlin, F., M. Fricker, A. Pielaat, S. Heisterkamp, R. Shaheen, M. S. Salonen, B. Svensson, C. Nguyen-The and M. Ehling-Schulz (2006). "Emetic toxin-producing strains of Bacillus cereus show distinct characteristics within the Bacillus cereus group." International Journal of Food Microbiology **109**(1-2): 132-138.

- Carlson, C. R., D. A. Caugant and A. B. Kolsto (1994). "Genotypic Diversity among *Bacillus-Cereus* and *Bacillus-Thuringiensis* Strains." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(6): 1719-1725.
- Carlson, C. R., T. Johansen and A. B. Kolsto (1996). "The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579." *Fems Microbiology Letters* **141**(2-3): 163-167.
- Dai, Z. H., J. C. Sirard, M. Mock and T. M. Koehler (1995). "The *Atxa* Gene-Product Activates Transcription of the Anthrax Toxin Genes and Is Essential for Virulence." *Molecular Microbiology* **16**(6): 1171-1181.
- Davison, S., E. Couture-Tosi, T. Candela, M. Mock and A. Fouet (2005). "Identification of the *Bacillus anthracis* ( $\gamma$ ) phage receptor." *J Bacteriol* **187**(19): 6742-6749.
- Declerck, N., L. Bouillaut, D. Chaix, N. Rugani, L. Slamti, F. Hoh, D. Lereclus and S. T. Arold (2007). "Structure of *PlcR*: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(47): 18490-18495.
- Dixon, T. C., M. Meselson, J. Guillemin and P. C. Hanna (1999). "Anthrax." *New England Journal of Medicine* **341**(11): 815-826.
- Drobniewski, F. A. (1993). "*Bacillus-Cereus* and Related Species." *Clinical Microbiology Reviews* **6**(4): 324-338.
- Drysdale, M., S. Heninger, J. Hutt, Y. H. Chen, C. R. Lyons and T. M. Koehler (2005). "Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax." *Embo Journal* **24**(1): 221-227.
- Edwards, K. A., H. A. Clancy and A. J. Baemner (2006). "*Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**(1): 73-84.
- Ehling-Schulz, M., M. Fricker, H. Grallert, P. Rieck, M. Wagner and S. Scherer (2006). "Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXOI." *Bmc Microbiology* **6**.
- Ehling-Schulz, M., B. Svensson, M. H. Guinebretiere, T. Lindback, M. Andersson, A. Schulz, M. Fricker, A. Christiansson, P. E. Granum, E. Martlbauer, C. Nguyen-The, M.

- Salkinoja-Salonen and S. Scherer (2005). "Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains." Microbiology-Sgm **151**: 183-197.
- Ehling-Schulz, M., N. Vukov, A. Schulz, R. Shaheen, M. Andersson, E. Martlbauer and S. Scherer (2005). "Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*." Applied and Environmental Microbiology **71**(1): 105-113.
- Fritze, D. (2004). "Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria." Phytopathology **94**(11): 1245-1248.
- Garbeva, P., J. A. van Veen and J. D. van Elsas (2003). "Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE." Microbial Ecology **45**(3): 302-316.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, E. Fiscarelli and S. Senesi (2007). "*Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils." Microbes and Infection **9**(5): 591-598.
- Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto and D. Lereclus (2008). "The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*." Plos One **3**(7).
- Gohar, M., N. Gilois, R. Graveline, C. Garreau, V. Sanchis and D. Lereclus (2005). "A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes." Proteomics **5**(14): 3696-3711.
- Gohar, M., O. A. Okstad, N. Gilois, V. Sanchis, A. B. Kolsto and D. Lereclus (2002). "Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon." Proteomics **2**(6): 784-791.
- Gominet, M., L. Slamti, N. Gilois, M. Rose and D. Lereclus (2001). "Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence." Molecular Microbiology **40**(4): 963-975.
- Guignot, J., M. Mock and A. Fouet (1997). "AtxA activates the transcription of genes harbored by both *Bacillus anthracis* virulence plasmids." Fems Microbiology Letters **147**(2): 203-207.
- Guinebretiere, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A. (2013). "*Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species

- of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning." Int J Syst Evol Microbiol **63** (Pt 1): 31-40.
- Guinebretiere, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P. (2008) "Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group." Environ Microbiol **10**(4): 851-866.
- Han, C. S., G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Altherr, S. S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland, M. Dimitrijevic, N. A. Doggett, J. J. Fawcett, T. Glavina, L. A. Goodwin, L. D. Green, K. K. Hill, P. Hitchcock, P. J. Jackson, P. Keim, A. R. Kewalramani, J. Longmire, S. Lucas, S. Malfatti, K. McMurry, L. J. Meincke, M. Misra, B. L. Moseman, M. Mundt, A. C. Munk, R. T. Okinaka, B. Parson-Quintana, L. P. Reilly, P. Richardson, D. L. Robinson, E. Rubin, E. Saunders, R. Tapia, J. G. Tesmer, N. Thayer, L. S. Thompson, H. Tice, L. O. Ticknor, P. L. Wills, T. S. Brettin and P. Gilna (2006). "Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*." J Bacteriol **188**(9): 3382-3390.
- Helgason, E., D. A. Caugant, I. Olsen and A. B. Kolsto (2000)a. "Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B-thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections." Journal of Clinical Microbiology **38**(4): 1615-1622.
- Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna and A. B. Kolsto (2000)b. "*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence." Applied and Environmental Microbiology **66**(6): 2627-2630.
- Hendriksen, N. B., B. M. Hansen and J. E. Johansen (2006). "Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **89**(2): 239-249.
- Hernandez, E., F. Ramiisse, T. Cruel, R. le Vagueresse and J. D. Cavallo (1999). "*Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection." Fems Immunology and Medical Microbiology **24**(1): 43-47.
- Hernandez, E., F. Ramiisse, J. P. Ducoureau, T. Cruel and J. D. Cavallo (1998). "*Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice." Journal of Clinical Microbiology **36**(7): 2138-2139.
- Hill, K. K., L. O. Ticknor, R. T. Okinaka, M. Asay, H. Blair, K. A. Bliss, M. Laker, P. E. Pardington, A. P. Richardson, M. Tonks, D. J. Beecher, J. D. Kemp, A. B. Kolsto, A.

- C. L. Wong, P. Keim and P. J. Jackson (2004). "Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(2): 1068-1080.
- Hoffmaster, A. R., K. K. Hill, J. E. Gee, C. K. Marston, B. K. De, T. Popovic, D. Sue, P. P. Wilkins, S. B. Avashia, R. Drumgoole, C. H. Helma, L. O. Ticknor, R. T. Okinaka and P. J. Jackson (2006). "Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and Harbor B-anthraxis virulence genes." *Journal of Clinical Microbiology* **44**(9): 3352-3360.
- Hoffmaster, A. R. and T. M. Koehler (1997). "The anthrax toxin activator gene *atxA* is associated with CO<sub>2</sub>-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*." *Infection and Immunity* **65**(8): 3091-3099.
- Hoffmaster, A. R., J. Ravel, D. A. Rasko, G. D. Chapman, M. D. Chute, C. K. Marston, B. K. De, C. T. Sacchi, C. Fitzgerald, L. W. Mayer, M. C. J. Maiden, F. G. Priest, M. Barker, L. X. Jiang, R. Z. Cer, J. Rilstone, S. N. Peterson, R. S. Weyant, D. R. Galloway, T. D. Read, T. Popovic and C. M. Fraser (2004). "Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(22): 8449-8454.
- Hoton, F. M., L. Andrup, I. Swiecicka and J. Mahillon (2005). "The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne." *Microbiology-Sgm* **151**: 2121-2124.
- Hovland, K. (2014). Multilocus Sequence Typing of close neighbours to *Bacillus anthracis* isolated from soil samples. (Masteroppgave).
- Hsueh, Y. H., E. B. Somers, D. Lereclus and A. C. L. Wong (2006). "Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(7): 5089-5092.
- Hu, X. M., I. Swiecicka, S. Timmerly and J. Mahillon (2009)a. "Sympatric soil communities of *Bacillus cereus* sensu lato: population structure and potential plasmid dynamics of pXO1-and pXO2-like elements." *Fems Microbiology Ecology* **70**(3): 344-355.
- Hu, X. M., G. Van der Auwera, S. Timmerly, L. Zhu and J. Mahillon (2009)b. "Distribution, Diversity, and Potential Mobility of Extrachromosomal Elements Related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 Virulence Plasmids." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(10): 3016-3028.

- Hudson, M. J., W. Beyer, R. Bohm, A. Fasanella, G. Garofolo, R. Golinski, P. L. Goossens, U. Hahn, B. Hallis, A. King, M. Mock, C. Montecucco, A. Ozin, F. Tonello and S. H. E. Kaufmann (2008). "Bacillus anthracis: Balancing innocent research with dual-use potential." International Journal of Medical Microbiology **298**(5-6): 345-364.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, M. Junker and L. A. Bulla (2010). "Bacillus thuringiensis: a genomics and proteomics perspective." Bioeng Bugs **1**(1): 31-50.
- Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek and N. Kyrpides (2003). "Genome sequence of Bacillus cereus and comparative analysis with Bacillus anthracis." Nature **423**(6935): 87-91.
- Jackson, P. J., K. K. Hill, M. T. Laker, L. O. Ticknor and P. Keim (1999). "Genetic comparison of Bacillus anthracis and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis." Journal of Applied Microbiology **87**(2): 263-269.
- Jensen, G. B., B. M. Hansen, J. Eilenberg and J. Mahillon (2003). "The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives." Environmental Microbiology **5**(8): 631-640.
- Jernigan, J. A., D. S. Stephens, D. A. Ashford, C. Omenaca, M. S. Topiel, M. Galbraith, M. Tapper, T. L. Fisk, S. Zaki, T. Popovic, R. F. Meyer, C. P. Quinn, S. A. Harper, S. K. Fridkin, J. J. Sejvar, C. W. Shepard, M. McConnell, J. Guarner, W. J. Shieh, J. M. Malecki, J. L. Gerberding, J. M. Hughes, B. A. Perkins and A. B. Investigation (2001). "Bioterrorism-related inhalational anthrax: The first 10 cases reported in the United States." Emerging Infectious Diseases **7**(6): 933-944.
- Keim, P., J. M. Gruendike, A. M. Klevytska, J. M. Schupp, J. Challacombe and R. Okinaka (2009). "The genome and variation of Bacillus anthracis." Mol Aspects Med **30**(6): 397-405.
- Keim, P., A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S. E. Travis, K. Richmond, D. M. Adair, M. Hugh-Jones, C. R. Kuske and P. Jackson (1997). "Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers." Journal of Bacteriology **179**(3): 818-824.
- Keim, P., A. M. Klevytska, L. B. Price, J. M. Schupp, G. Zinser, K. L. Smith, M. E. Hugh-Jones, R. Okinaka, K. K. Hill and P. J. Jackson (1999). "Molecular diversity in Bacillus anthracis." Journal of Applied Microbiology **87**(2): 215-217.

- Keim, P., L. B. Price, A. M. Klevytska, K. L. Smith, J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J. Jackson and M. E. Hugh-Jones (2000). "Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*." Journal of Bacteriology **182**(10): 2928-2936.
- Kim, I. G., J. W. Lee, S. C. Suh and S. L. Rhim (2004). "Characterization and identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis* SR6 and SR8." Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(4): 772-776.
- Klee, S. R., E. B. Brzuszkiewicz, H. Nattermann, H. Bruggemann, S. Dupke, A. Wollherr, T. Franz, G. Pauli, B. Appel, W. Liebl, E. Couacy-Hymann, C. Boesch, F. D. Meyer, F. H. Leendertz, H. Ellerbrok, G. Gottschalk, R. Grunow and H. Liesegang (2010). "The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids." PLoS One **5**(7): e10986.
- Klee, S. R., M. Ozel, B. Appel, C. Boesch, H. Ellerbrok, D. Jacob, G. Holland, F. H. Leendertz, G. Pauli, R. Grunow and H. Nattermann (2006)a. "Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon." J Bacteriol **188**(15): 5333-5344.
- Klee, S. R. Nattermann, H. Becker, S. Urban-Schriefer, M. Franz, T. Jacob, D. and Appel, B. (2006)b. "Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group." Journal of Applied Microbiology **100**(4): 673-681.
- Ko, K. S., J. W. Kim, J. M. Kim, W. Kim, S. I. Chung, I. J. Kim and Y. H. Kook (2004). "Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene." Infection and Immunity **72**(9): 5253-5261.
- Koehler, T. M. (2002). "*Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation." Anthrax **271**: 143-164.
- Koehler, T. M. (2009). "*Bacillus anthracis* physiology and genetics." Molecular Aspects of Medicine **30**(6): 386-396.
- Kolsto, A. B., N. J. Tourasse and O. A. Okstad (2009). "What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?" Annu Rev Microbiol **63**: 451-476.
- Lapidus, A., E. Goltsman, S. Auger, N. Galleron, B. Segurens, C. Dossat, M. L. Land, V. Broussolle, J. Brillard, M. H. Guinebretiere, V. Sanchis, C. Nguen-the, D. Lereclus, P. Richardson, P. Wincker, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich and A. Sorokin (2008). "Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity." Chemico-Biological Interactions **171**(2): 236-249.



- Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G. S. A. B. Stewartz and S. Scherer (1998). "Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the Bacillus cereus group." International Journal of Systematic Bacteriology **48**: 1373-1382.
- Leendertz, F. H., H. Ellerbrok, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, K. Matz-Rensing, R. Hakenbeck, C. Bergmann, P. Abaza, S. Junglen, Y. Moebius, L. Vigilant, P. Formenty and G. Pauli (2004). "Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest." Nature **430**(6998): 451-452.
- Leendertz, F. H., F. Lankester, P. Guislain, C. Neel, O. Drori, J. Dupain, S. Speede, P. Reed, N. Wolfe, S. Loul, E. Mpoudi-Ngole, M. Peeters, C. Boesch, G. Pauli, H. Ellerbrok and E. M. Leroy (2006). "Anthrax in western and Central African great apes." American Journal of Primatology **68**(9): 928-933.
- Leendertz, F. H., S. Yumlu, G. Pauli, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, L. Vigilant, S. Junglen, S. Schenk and H. Ellerbrok (2006). "A new Bacillus anthracis found in wild chimpanzees and a gorilla from west and central Africa." Plos Pathogens **2**(1): 1-4.
- Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, S. Salamitou and V. Sanchis (1996). "Identification of a Bacillus thuringiensis gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase." Journal of Bacteriology **178**(10): 2749-2756.
- Lucking, G., M. K. Dommel, S. Scherer, A. Fouet and M. Ehling-Schulz (2009). "Cereulide synthesis in emetic Bacillus cereus is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR." Microbiology-Sgm **155**: 922-931.
- Luna, V. A., K. K. Peak, W. O. Veguilla, F. Reeves, L. Heberlein-Larson, A. C. Cannons, P. Amuso and J. Cattani (2005). "Use of two selective media and a broth motility test can aid in identification or exclusion of Bacillus anthracis." Journal of Clinical Microbiology **43**(9): 4336-4341.
- Lund, T., M. L. De Buyser and P. E. Granum (2000). "A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis." Molecular Microbiology **38**(2): 254-261.
- Mahler, H., A. Pasi, J. M. Kramer, P. Schulte, A. C. Scoging, W. Bar and S. Krahenbuhl (1997). "Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of Bacillus cereus." New England Journal of Medicine **336**(16): 1142-1148.

- Mair, M. (2008). "Lone Suspect in the Amerithrax Investigation Identified, but Skepticism Remains." Biosecurity and Bioterrorism-Biodefense Strategy Practice and Science **6**(4): 285-287.
- Makino, S., I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa and M. Yoshikawa (1989). "Molecular Characterization and Protein-Analysis of the Cap Region, Which Is Essential for Encapsulation in Bacillus-Anthraxis." Journal of Bacteriology **171**(2): 722-730.
- Margulis, L., J. Z. Jorgensen, S. Dolan, R. Kolchinsky, F. A. Rainey and S. C. Lo (1998). "The Arthromitus stage of Bacillus cereus: Intestinal symbionts of animals." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(3): 1236-1241.
- Maughan, H. and G. Van der Auwera (2011). "Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading." Infection Genetics and Evolution **11**(5): 789-797.
- McIntyre, L., K. Bernard, D. Beniac, J. L. Isaac-Renton and D. C. Naseby (2008). "Identification of Bacillus cereus Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada." Applied and Environmental Microbiology **74**(23): 7451-7453.
- Mignot, T., M. Mock, D. Robichon, A. Landier, D. Lereclus and A. Fouet (2001). "The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in Bacillus anthracis." Mol Microbiol **42**(5): 1189-1198.
- Mock, M. and A. Fouet (2001). "Anthrax." Annual Review of Microbiology **55**: 647-671.
- Oh, S. Y., J. M. Budzik, G. Garufi and O. Schneewind (2011). "Two capsular polysaccharides enable Bacillus cereus G9241 to cause anthrax-like disease." Mol Microbiol **80**(2): 455-470.
- Okinaka, R., T. Pearson and P. Keim (2006). "Anthrax, but not Bacillus anthracis?" Plos Pathogens **2**(11): 1025-1027.
- Okinaka, R. T., K. Cloud, O. Hampton, A. R. Hoffmaster, K. K. Hill, P. Keim, T. M. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, J. Mahillon, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svensson and P. J. Jackson (1999). "Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes." Journal of Bacteriology **181**(20): 6509-6515.

- Okstad, O. A., M. Gominet, B. Purnelle, M. Rose, D. Lereclus and A. B. Kolsto (1999). "Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin." Microbiology-Uk **145**: 3129-3138.
- Olsen, J. S. Skogan, G. Fykse, E. M. Rawlinson, E. L. Tornaso, H. Granurn, P. E. and Blatny, J. M. (2007) "Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*" Journal of Microbiological Methods **71**(3): 265-274.
- Pannucci, J., R. T. Okinaka, R. Sabin and C. R. Kuske (2002). "Bacillus anthracis pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species." Journal of Bacteriology **184**(1): 134-141.
- Pannucci, J., R. T. Okinaka, E. Williams, R. Sabin, L. O. Ticknor and C. R. Kuske (2002). "DNA sequence conservation between the Bacillus anthracis pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria." Bmc Genomics **3**.
- Pepper, I. L. and T. J. Gentry (2002). "Incidence of *Bacillus anthracis* in soil." Soil Science **167**(10): 627-635.
- Pomerantsev, A. P., O. M. Pomerantseva and S. H. Leppla (2004). "A spontaneous translational fusion of *Bacillus cereus* PlcR and PapR activates transcription of PlcR-dependent genes in *Bacillus anthracis* via binding with a specific palindromic sequence." Infection and Immunity **72**(10): 5814-5823.
- Rasko, D. A., M. R. Altherr, C. S. Han and J. Ravel (2005). "Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms." Fems Microbiology Reviews **29**(2): 303-329.
- Rasko, D. A., J. Ravel, O. A. Okstad, E. Helgason, R. Z. Cer, L. X. Jiang, K. A. Shores, D. E. Fouts, N. J. Tourasse, S. V. Angiuoli, J. Kolonay, W. C. Nelson, A. B. Kolsto, C. M. Fraser and T. D. Read (2004). "The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1." Nucleic Acids Research **32**(3): 977-988.
- Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, O. A. Okstad, D. E. Fouts, L. X. Jiang, R. Z. Cer, A. B. Kolsto, S. R. Gill and J. Ravel (2007). "Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the B-cereus-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1." Journal of Bacteriology **189**(1): 52-64.

- Read, T. D., S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. X. Jiang, E. Holtzapple, J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim and C. M. Fraser (2002). "Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*." Science **296**(5575): 2028-2033.
- Reddy, A., L. Battisti and C. B. Thorne (1987). "Identification of Self-Transmissible Plasmids in 4 *Bacillus-Thuringiensis* Subspecies." Journal of Bacteriology **169**(11): 5263-5270.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Saile, E. and T. M. Koehler (2006). "Bacillus anthracis multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants." Applied and Environmental Microbiology **72**(5): 3168-3174.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). "The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." Molecular Biology and Evolution **4**(4): 406-425.
- Salamitou, S., F. Ramisse, M. Brehelin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez and D. Lereclus (2000). "The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects." Microbiology-Uk **146**: 2825-2832.
- Sastalla, I., Maltese, L. M., Pomerantseva, O. M., Pomerantsev, A. P., Keane-Myers, A. and Leppla, S. H. (2010). "Activation of the latent PlcR regulon in *Bacillus anthracis*." Microbiology-Sgm **156**: 2982-2993.
- Scarano, C., S. Viridis, F. Cossu, R. Frongia, E. P. L. De Santis and A. M. Cosseddu (2009). "The pattern of toxin genes and expression of diarrheal enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* strains isolated from commercial bioinsecticides." Veterinary Research Communications **33**: S257-S260.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998). "Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 775-+.
- Schwartz, M. (2009). "Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax." Mol Aspects Med **30**(6): 347-355.
- Shinagawa, K. (1990). "Analytical Methods for *Bacillus-Cereus* and Other *Bacillus* Species." International Journal of Food Microbiology **10**(2): 125-142.
- Slamti, L. and D. Lereclus (2002). "A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group." Embo Journal **21**(17): 4550-4559.

- Slamti, L. and D. Lereclus (2005). "Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group." Journal of Bacteriology **187**(3): 1182-1187.
- Slamti, L., S. Perchat, M. Gominet, G. Vilas-Boas, A. Fouet, M. Mock, V. Sanchis, J. Chaufaux, M. Gohar and D. Lereclus (2004). "Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic." Journal of Bacteriology **186**(11): 3531-3538.
- Soberon, M., L. Pardo-Lopez, I. Lopez, I. Gomez, B. E. Tabashnik and A. Bravo (2007). "Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance." Science **318**(5856): 1640-1642.
- Sozhamannan, S., M. D. Chute, F. D. McAfee, D. E. Fouts, A. Akmal, D. R. Galloway, A. Mateczun, L. W. Baillie and T. D. Read (2006). "The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision-proficient, putative prophages." Bmc Microbiology **6**.
- Sternbach, G. (2003). "The history of anthrax." Journal of Emergency Medicine **24**(4): 463-467.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution **30**: 2725-2729.
- Tallent, S. M., K. M. Kotewicz, E. A. Strain and R. W. Bennett (2012). "Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group." Journal of Aoac International **95**(2): 446-451.
- Thorsen, L., B. M. Hansen, K. F. Nielsen, N. B. Hendriksen, R. K. Phipps and B. B. Budde (2006). "Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 5118-5121.
- Tinsley, E., A. Naqvi, A. Bourgoigne, T. M. Koehler and S. A. Khan (2004). "Isolation of a minireplicon of the virulence plasmid pXO2 of *Bacillus anthracis* and characterization of the plasmid-encoded RepS replication protein." Journal of Bacteriology **186**(9): 2717-2723.
- Tourasse, N. J., E. Helgason, O. A. Okstad, I. K. Hegna and A. B. Kolsto (2006). "The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics." Journal of Applied Microbiology **101**(3): 579-593.

- Turnbull, P. C. B., R. A. Hutson, M. J. Ward, M. N. Jones, C. P. Quinn, N. J. Finnie, C. J. Duggleby, J. M. Kramer and J. Melling (1992). "Bacillus-Anthraxis but Not Always Anthrax." Journal of Applied Bacteriology **72**(1): 21-28.
- Tutrone, W. D., N. S. Scheinfeld and J. M. Weinberg (2002). "Cutaneous anthrax: A concise review." Cutis **69**(1): 27-33.
- Uchida, I., J. M. Hornung, C. B. Thorne, K. R. Klimpel and S. H. Leppla (1993). "Cloning and Characterization of a Gene Whose Product Is a Transactivator of Anthrax Toxin Synthesis." Journal of Bacteriology **175**(17): 5329-5338.
- Uchida, I., T. Sekizaki, K. Hashimoto and N. Terakado (1985). "Association of the Encapsulation of Bacillus-Anthraxis with a 60 Megadalton Plasmid." Journal of General Microbiology **131**(Feb): 363-367.
- Untergrasser, A., I. Cutcutache, T. KÄµressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen. (2012). "Primer3 - new capabilities and interfaces." Nucleic Acids Research **115**. from <http://primer3.sourceforge.net/>.
- Van der Auwera, G. and J. Mahillon (2008). "Transcriptional analysis of the conjugative plasmid pAW63 from Bacillus thuringiensis." Plasmid **60**(3): 190-199.
- Van der Auwera, G. A., L. Andrup and J. Mahillon (2005). "Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the Bacillus anthracis virulence plasmid pXO2 and of the Bacillus thuringiensis plasmid pBT9727." Bmc Genomics **6**.
- Van der Auwera, G. A., S. Timmerly, F. Hoton and J. Mahillon (2007). "Plasmid exchanges among members of the Bacillus cereus group in foodstuffs." Int J Food Microbiol **113**(2): 164-172.
- Van der Auwera, G. A., S. Timmerly and J. Mahillon (2008). "Self-transfer and mobilisation capabilities of the pXO2-like plasmid pBT9727 from Bacillus thuringiensis subsp. konkukian 97-27." Plasmid **59**(2): 134-138.
- Van Ert, M. N., W. R. Easterday, L. Y. Huynh, R. T. Okinaka, M. E. Hugh-Jones, J. Ravel, S. R. Zanecki, T. Pearson, T. S. Simonson, J. M. U'Ren, S. M. Kachur, R. R. Leadem-Dougherty, S. D. Rhoton, G. Zinser, J. Farlow, P. R. Coker, K. L. Smith, B. X. Wang, L. J. Kenefic, C. M. Fraser-Liggett, D. M. Wagner and P. Keim (2007). "Global Genetic Population Structure of Bacillus anthracis." Plos One **2**(5).

Vilas-Boas, G. T., A. P. S. Peruca and O. M. N. Arantes (2007). "Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*." Canadian Journal of Microbiology **53**(6): 673-687.

WHO (2003). "WHO Manual for laboratory diagnosis of anthrax."

Wilson, M. K., J. M. Vergis, F. Alem, J. R. Palmer, A. M. Keane-Myers, T. N. Brahmbhatt, C. L. Ventura and A. D. O'Brien (2011). "Bacillus cereus G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice." Infect Immun **79**(8): 3012-3019.

Wright, A. M., S. B. Beres, E. N. Consamus, S. W. Long, A. R. Flores, R. Barrios, G. S. Richter, S. Y. Oh, G. Garufi, H. Maier, A. L. Drews, K. E. Stockbauer, P. Cernoch, O. Schneewind, R. J. Olsen and J. M. Musser (2011). "Rapidly Progressive, Fatal, Inhalation Anthrax-like Infection in a Human Case Report, Pathogen Genome Sequencing, Pathology, and Coordinated Response." Archives of Pathology & Laboratory Medicine **135**(11): 1447-1459.

Økstad, O. A. and A.-B. Kolstø (2011). "Genomics of *Bacillus* Species." 29-53.