MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 101 - 108

Ocena przydatności metody multiplex PCR do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów z grupy *Bacillus cereus*

Evaluation of multiplex PCR to identify the species of microorganisms from *Bacillus cereus* group

Kamila Formińska, Aleksandra Anna Zasada, Marek Jagielski

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego- Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Oceniono przydatność metody multiplex PCR opisanej przez *Park i wsp*. (J Microbiol Biotechnol 2007; 17: 1177-82) do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów z grupy *Bacillus cereus*. Stwierdzono przydatność metody do potwierdzenia przynależności badanego szczepu do tej grupy. Nie potwierdzono natomiast swoistości oligonukleotydów starterowych użytych w celu identyfikacji poszczególnych gatunków wchodzących w skład grupy *B. cereus*.

ABSTRACT

Introduction: *Bacillus* genus comprises about 215 species. The most closely related are *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis, B. mycoides, B. pseudomycoides* and *B. weihenstephanensis*. These bacterial species belong to the *Bacillus cereus* group. Identification and differentiation of *Bacillus cereus* group bacteria is difficult because of genetic and phenotypic similarity. Many molecular methods have already been suggested to differentiate *B. cereus* group members. However easier and more convenient methods are still sought. The aim of this study was to evaluate of multiplex PCR method to identify and distinguish strains of *Bacillus cereus* group, as proposed by Park et al. (J Microbiol Biotechnol 2007; 17: 1177-82).
Materials and method: Twenty four strains of *Bacillus cereus* group included *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* and *B. weihestephanensis* was examined. A multiplex-PCR assay for the differentiation of the species has been applied by using three pairs specific oligonucleotide primers based on sequences of *gyrB* genes which identify species from *Bacillus cereus* group and one pair specific primers based on sequences of *groEL* gene, which are used to identify *Bacillus cereus* group.
Results: Using a specific primers complementary to fragment of *groEL* gene, we received all PCR products and thus we identified *Bacillus cereus* group. We have not recived a specific products characteristic for each of the species. Oligonucleotide primers recognized

by *Park et al*. as specific for each species were complementary (often 100%) for the *gyrB* gene sequence in almost all species of the *B. cereus* group.
Conclusions: The multiplex PCR method proposed by Park et al. multiplex PCR method for identification of *B. cereus* group and individual bacterial species has been proved to be useful only for identification the entire group of *B. cereus*. This method does not provide specific identification of the individual species. Lack of specificity of the primers used in this study creates a risk of obtaining PCR product in more than one species of the entire examined group of bacteria and does not allow the precise identification to the species level.

WSTĘP

Do rodzaju *Bacillus* należy obecnie ponad 215 gatunków, z których do najbardziej ze sobą spokrewnionych należą *B. thuringiensis*, *B. cereus* sensu stricto, *B. anthracis*, *B. weinhenstephanensis, B. mycoides* i *B. pseudomycoides*. Gatunki te nazywane „pierwszą grupą *Bacillus"* (12) zaliczono do osobnej grupy *Bacillus cereus* (3) Stanowią one grupę drobnoustrojów o bardzo podobnych właściwościach fenotypowych i genotypowych (7). Bakterie należące do tej grupy wykazują znaczące podobieństwo w strukturze komórkowej i fizjologii oraz posiadają podobne systemy wymiany materiału genetycznego. Najczęściej różnią się miedzy sobą zdolnością do produkcji endotoksyn, ruchliwością, zróżnicowaną aktywnością hemolityczną oraz zdolnością do wzrostu w obniżonej temperaturze, nawet poniżej 7 C° (7). Są to Gram-dodatnie laseczki, żyjące w warunkach tlenowych, lub względnie beztlenowych, najczęściej zdolne do ruchu i wytwarzania przetrwalników. Rezerwuarem drobnoustrojów z tej grupy jest głównie gleba, skąd jako zanieczyszczenia mogą trafiać na surowce roślinne i zwierzęce (1). Mimo licznych podobieństw genotypowych bakterie z grupy *B. cereus* wyróżniają się stopniem chorobotwórczości. W przypadku *B. cereus* sensu *stricto* związana jest ona z wytwarzaniem toksyny emetycznej (wymiotnej), enterotoksyn, hemolizyny i fosfolipazy C (10). Szczepy *B. cereus* zdolne są do wytwarzania ciepłoopornych endospor, które w przypadku nieodpowiedniego przechowywania zainfekowanej żywności mają zdolność do kiełkowania i namnażania się, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia osób spożywających te produkty (18).

B. cereus może wywoływać dwa różne typy zakażeń układu pokarmowego. Pierwszy z nich powoduje nudności i wymioty, a czas rozwoju objawów wynosi od jednej do sześciu godzin. Drugi uznawany za „łagodniejszy" charakteryzuje się biegunką i bólem brzucha, gdzie objawy obserwowane są pomiędzy szóstą a dwudziestą czwartą godziną od zakażenia.

Inną bakterią z tej grupy, uznawaną za powszechnie występujący bioinsektycyd jest *B. thuringiensis*. Bakterie te zostały odkryte w Japonii w 1901 r. przez Shigetane Ishiwatari w larwach jedwabnika morwowego (17). Naturalnym środowiskiem bytowania tego drobnoustroju jest gleba oraz roślinność. Występować może również w żywych i martwych owadach. Obecnie poznanych jest ok. 82 serowarów pochodzących z 22 krajów (14). Podczas sporulacji tych bakterii dochodzi do produkcji krystalicznych białek, które po przedostaniu się do zasadowej treści jelitowej owada przy obecności odpowiednich proteaz przekształcane są do δ-ednotoksyn. Toksyny te powodują powstawanie por w błonie komórek nabłonka jelitowego owada, co wywołuje destabilizację jonową i w konsekwencji prowadzi do śmierci owada (17).

Kolejną bakterią z grupy *B. cereus* jest *B. anthracis*, który jest etiologicznym czynnikiem wąglika - choroby zakaźnej zwierząt, głównie przeżuwaczy, przenoszoną na ludzi przez kontakt ze zwierzętami lub produktami pochodzenia zwierzęcego. Podstawową cechą, odróżniającą *B. anthracis* od pozostałych gatunków z grupy B. *cereus* jest zdolność do wytwarzania „wąglikowej toksyny" oraz otoczki polipeptydowej złożonej głównie z kwasu D-glutaminowego, podczas gdy większość bakterii posiada otoczki polisacharydowe. Zjadliwość laseczki wąglika związana jest z obecnością dwóch plazmidów pXO1-odpowiedzialnego za wytwarzanie wyżej wymienionej toksyny i kiełkowanie przetrwalników oraz plazmidu pXO2- niosącego geny odpowiedzialne za powstawanie i degradację otoczki (12).

Cechami fenotypowymi odróżniającymi *B. anthracis* od innych bakterii z grupy *B. cereus* jest między innymi brak ruchu, brak hemolizy oraz wysoka wrażliwość na penicylinę (8).

Stosunkowo nowym gatunkiem, opisanym przez Freisinga-Weihenstephana jest *B. weihenstephanensis*, który został włączony do grupy *B. cereus* w 1998 roku (20). Podstawową cechą odróżniającą go od pozostałych drobnoustrojów tej grupy jest zdolność do wzrostu w hodowli płynnej w temperaturze 7 C° oraz brak zdolności do wzrostu w temperaturze skrajnie wysokiej dochodzącej do 43 C°. Inną cechą odróżniającą jest obecność charakterystycznej sekwencji w podjednostce 16S rDNA, oraz sekwencji genu *cspA*, kodującego białka szoku cieplnego (13). Gatunek ten podobnie jak *B. cereus* może stanowić ryzyko zatrucia pokarmowego, w wyniku spożycia skażonych produktów spożywczych.

B. mycoides i *B. pseudomycoides* podobnie jak *B. anthracis* są nieruchliwe, jednak tworzą bardzo charakterystyczne rizoidalne kolonie podczas wzrostu na stałych podłożach mikrobiologicznych. Badania dowodzą, iż *B. cereus* i *B. mycoides* posiadają niemal identyczne właściwości fizjologiczne i biochemiczne (15).

Ze względu na bardzo bliskie pokrewieństwo genetyczne wyżej wymienionych drobnoustrojów, oraz znacząco różną chorobotwórczość niezwykle istotnym jest odpowiednie dobranie metody ich wykrywania i identyfikacji. Celem pracy była ocena przydatności zaproponowanej przez *Park i wsp*. (16) metody multiplex PCR do równoczesnej identyfikacji i różnicowania szczepów z grupy *B. cereus* z uwzględnieniem ich przynależności gatunkowej.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakteryjne: Do badań użyto dwadzieścia cztery szczepy, w tym: dziewięć szczepów z gatunku *B. cereus*, pięć z gatunku *B. thuringiensis*, osiem z gatunku *B. anthracis* oraz dwa szczepy z gatunku *B. weihenstephanesis* (Tabela I).

Izolacja DNA: Do izolacji materiału genetycznego zastosowano metodę opisaną przez *Gierczyńskiego i wsp*. (6).

Metoda Multiplex PCR: Do identyfikacji szczepów z rodzaju *Bacillus* wykorzystana została metoda zaproponowana przez *Park i wsp*. (16). Do reakcji użyte zostały grupy oligonukleotydów starterowych zamieszczone w tabeli II. W przypadku szczepów należących do gatunku *B. anthracis*, *B. thuringensis, B. weihenstephanensis* oraz *B. cereus* poszukiwano genu *gyrB*, natomiast identyfikacje całej grupy *B. cereus*, oparto na wykryciu fragmentu genu *groEL*.

Ilości poszczególnych składników mieszaniny jak i warunki reakcji dobrane były zgodnie z procedurą *Park i wsp*. (16). Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl. Reakcję

Tabela I. Szczepy użyte w badaniach.

B. cereus	*B. anthracis*	*B. thuringiensis*	*B. weihenstephanensis*
1230-88	BL1	HD293	10204
ATCC -53522	BL2	HD7	10381
F2-1	BL5	HD16	
AH-523	BL6	HD3	
S2-8	BL7	HD120	
AH-590	BL10		
D-17	BL11		
ATCC 4342	BL12		
S1-7			

Tabela II. Sekwencje oligonukleotydów starterowych użytych w badaniach.

Szczep	Starter	Sekwencja(5'-3')	Gen/wielkość amplikonu
B. cereus - grupa	BCGSH-1F	GTG CGA ACC CAA TGG GTC TTC	*groEL*/400bp
	BCGSH-1R	CCT TGT TGT ACC ACT TGC TC	
B. anthracis	BASH-2F	GGT AGA TTA GCA GAT TGC TCT TCA AAA GA	*gyrB*/253bp
	BASH-2R	ACG AGC TTT CTC AAT ATC AAA ATC TCC GC	
B. thuringiensis	BTJH-1F	GCT TAC CAG GGA AAT TGG CAG	*gyrB*/299bp
	BTJH-R	ATC AAC GTC GGC GTC GG	
B. cereus	BCJH-F	TCA TGA AGA GCC TGT GTA CG	*gyrB*/475bp
	BCJH-1R	CGA CGT GTC AAT TCA CGC GC	

Tabela III. Stężenia oligonukleotydów starterowych w mieszaninie reakcyjnej PCR.

Symbol startera	Stężenia wg. Parka i wsp.	Wariant I	Wariant II
BCGSH-F	48 nM	32 nM	48 nM
BCGSH-R			
BASH-F	80 nM	60 nM	32 nM
BASH-R			
BTJH-F	32 nM	48 nM	60 nM
BTJH-R			
BCJH-F	40 nM	60 nM	60 nM
BCJH-R			

przeprowadzono w termocyklerze Mastercykler firmy Eppendorf. Analiza produktów reakcji opierała się na rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym, przygotowanym zgodnie z procedurą *Park i wsp*. (16).

Ponadto zbadano wpływ różnych stężeń użytych oligonukleotydów starterowych na wynik reakcji multiplex PCR (Tabela III).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzono reakcję multiplex PCR, zgodnie z procedurą opisaną przez *Park i wsp*. (16) dla czterech par oligonukleotydów starterowych w tym: BCGSH, wykrywającego fragment genu *groEL*, charakterystycznego dla grupy *B. cereus*, BASH dla wykrycia fragmentu genu *gyrB* u szczepów *B. anthracis*, BTJH, dla wykrycia fragmentu genu *gyrB* u szczepów *B. thuringiensis* i BCJH dla wykrycia fragmentu genu *gyrB* u *B. cereus*. Produkt reakcji z użyciem oligonukleotydów starterowych komplementarnych dla fragmentu genu *groEL* uzyskano w przypadku wszystkich badanych szczepów z wyjątkiem *B. weihenstephanensis*. W przypadku użycia starterów BASH uzyskano produkt o wielkości 253 bp, dla wszystkich szczepów *B. anthracis*, oraz dodatkowo dla szczepu *B. cereus* S2-8 i D17 i dla szczepu *B. thuringiensis* HD3. Produkt wielkości 299 bp uzyskano, przy użyciu starterów BTJH, dla 6 z 9 badanych szczepów *B. cereus* i dla dwóch szczepów z gatunku *B. thuringiensis* HD120 i HD7. Nie uzyskano go dla szczepów F2-1, S2-8 i D17 *B. cereus*. Nie uzyskano tego produktu także dla żadnego ze szczepów *B. anthracis*. Produkt o wielkości 475 bp ze

Tabela IV. Wyniki reakcji multiplex PCR z badaną grupą szczepów.

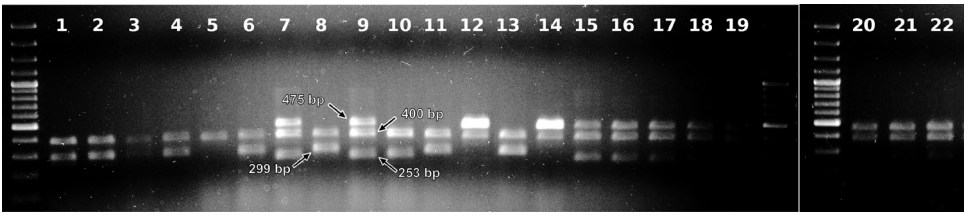
Szczep	Wyniki reakcji multiplex PCR ze straterami			
	BCGSH	BASH	BTJH	BCJH
B. cereus ATCC 4342	+	-	+	-
B. cereus S1-7	+	-	+	-
B. cereus 1230-88	+	-	+	-
B.cereus ATCC 53522	+	-	+	-
B. cereus F2-1	+	-	-	-
B. cereus AH 523	+	-	+	-
B. cereus S2-8	+	+	-	+
B. cereus AH590	+	-	+	-
B. cereus D-17	+	+	-	+
B. thuringiensis HD3	+	+	-	-
B. thuringiensis HD120	+	-	+	-
B. thuringiensis HD293	+	-	-	+
B. thuringiensis HD7	+	-	+	-
B. thuringiensis HD16	+	-	-	+
B. anthracis BL1	+	+	-	+
B. anthracis BL2	+	+	-	+
B. anthracis BL5	+	+	-	+
B. anthracis BL6	+	+	-	+
B. anthracis BL7	+	+	-	+
B. anthracis BL10	+	+	-	+
B. anthracis BL11	+	+	-	+
B. anthracis BL12	+	+	-	+
B. weihenstephanensis 10204	-	-	-	-
B. weihenstaphanensis 10381	-	-	-	-

+ obecność produktu reakcji o spodziewanej wielkości
- brak produktu reakcji

starterami BCJH uzyskano dla dwóch szczepów *B. cereus* o symbolu S2-8 oraz D-17, dla dwóch z gatunku *B. thuringiensis* o symbolu HD293 i HD16, oraz dla wszystkich szczepów z gatunku *B. anthracis* (Tabela IV).

Podjęte próby przeprowadzenia rekcji multiplex PCR ze zmniejszonymi lub zwiększonymi stężeniami poszczególnych oligonukleotydów starterowych nie dały spodziewanych wyników, gdyż prowadziły do całkowitego braku produktu jak to miało miejsce w przypadku poszukiwania genu *groEL* przy użyciu oligonukleotydów starterowych BCGSH lub nie zmieniały w istotny sposób możliwość uzyskania swoistych produktów z pozostałymi starterami.

Grupa *B. cereus* obejmuje gatunki blisko ze sobą spokrewnione. Identyfikacja i rozróżnienie międzygatunkowe jest utrudnione ze względu na duże podobieństwo w obrębie całego genomu. Szczepy te wykazują wysoki stopień podobieństwa rDNA, oraz niewielkie różnice w obrębie podjednostki 16S rRNA. Zastosowano wiele metod do rozróżnienia gatunków w obrębie grupy *B. cereus*, do których zaliczyć można : hybrydyzację DNA całego genomu (2), analizę sekwencji operonu 16S-23S (8), sekwencjonowanie rejonów ISRs (intergenic spacer regions) pomiędzy genami *gyrB-gyrA* (8), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (4), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) (11), czynniki wirulencji (19), AP-PCR (arbitrary PCR) (9) oraz PCR-RFLP (PCR –Restriction Fragment Length Polymorphism) (5). Pomimo licznych badań identyfikacja w obrębie grupy *B. cereus* stanowi wciąż spory problem. Zaproponowana przez *Park i wsp*. (16) metoda multiplex PCR wydała się ciekawą alternatywą dla molekularnej identyfikacji grupy *B. cereus* oraz poszczególnych gatunków wchodzących w jej skład. Przeprowadzone przez nas badania pokazały, że najwłaściwszym z poszukiwanych markerów był fragment genu *groEL*, pozwalający określić przynależność szczepu do grupy *B. cereus*. Ze starterami dla *groEL* otrzymano produkt dla wszystkich badanych szczepów z wyjątkiem szczepów należących do gatunku *B. weihenstephanesis*. Oligonukleotydy starterowe BASH użyte w reakcji do syntezy markerów charakterystycznych dla *B. anthracis* pozwoliły na zamplifikowanie fragmentu genu *gyrB* także u szczepów *B. cereus*, co nie tylko potwierdza bardzo wysokie podobieństwo sekwencji badanego genu u obu tych gatunków, ale także wskazuje na ograniczoną przydatność zaproponowanych oligonukleotydów starterowych do identyfikacji szczepów *B. anthracis*. Podobny problem wystąpił przy użyciu starterów BTJH do wyodrębnienia szczepów należących do gatunku *B. thuringiensis*, gdyż produkt o wielkości 299 bp uzyskano także ze szczepami należącymi do gatunku *B. cereus*.



Rycina I. Obraz elektroforetycznego rozdziału fragmentów DNA powstałych w reakcji multiplex-PCR ze starterami BCJH (475 bp), BCGSH (400 bp), BTJH (299bp), BASH (253 bp). Zastosowano wzorzec wielkości DNA – 100bp GeneRuller. Ścieżki oznaczone liczbami od 1 do 22 przedstawiają produkty reakcji dla kolejnych szczepów zamieszczonych w Tabeli IV: 1 – 9 *B. cereus,* 10 -14 *B. thuringiensis*, 15 – 22 *B. anthracis*

Ze względu na nieswoiste wyniki, postanowiono zweryfikować swoistość sekwencji oligonukleotydów starterowych w dostępnych internetowych bazach danych. Posługując się narzędziem do porównywania sekwencji nukleotydowych BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) potwierdzono komplementarność oraz swoistość użytych oligonukleotydów starterowych z fragmentem genu *gyrB*, dla poszczególnych gatunków z grupy *B. cereus*. Nie udało się jednak potwierdzić ich swoistości dla szczepów należących do poszczególnych gatunków. Oligonukleotydy starterowe uznane przez *Park i wsp*. (16) za swoiste dla poszczególnych gatunków były komplementarne (wielokrotnie w 100%) do sekwencji genu *gyrB* u niemal każdego z gatunków należących do grupy *B. cereus*. Potwierdza to ryzyko uzyskania danego produktu PCR dla szczepów należących do różnych gatunków grupy *B. cereus* co nie daje możliwości dokładnej identyfikacji gatunkowej badanego szczepu.

WNIOSKI

Zaproponowana przez *Park i wsp*. (16) metoda multiplex PCR do identyfikacji grupy *B. cereus* oraz poszczególnych gatunków bakterii wchodzących w jej skład, okazała się przydatna jedynie do identyfikacji całej grupy *B. cereus*. Metoda ta nie zapewnia swoistej identyfikacji gatunkowej badanych szczepów.

PIŚMIENNICTWO

1. *Agron PG, Hill KK* i inni. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2755-64.
2. *Ash C, Farrow JA, Dorsch E, Stackebrandt E, Collins MD*. Comparative analysis of *Bacillus anthracis, Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse trascriptase sequencing of 16S rRNA. Int J Syst Bacteriol 1991; 41: 343-6.
3. *Bednarczyk A, Daczkowska-Kozon EG*. Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. Post Mikrobiol 2008; 47: 51-63.
4. *Carlson CR, Caugant D, Kolsto A*. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 1719-25.
5. *Chang YH, Shangkuan H, Lin HC* I inni. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 4502-10.
6. *Gierczyński R, Kałużewski S, Rakin A*. i inni. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland –the molecular echoes of the past outbreaks. FEMS Microbiol Lett 2004; 15: 235-40.
7. *Hansen BM, Leser TD, Hendriksen NB*. Polymarase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. FEMS Microbiol Lett. 2001; 202: 209-13.
8. *Harrel L J, Andersen GL, Wilson KH*. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. J Clin Microbiol 1995; 33:1847-50.
9. *Henderson I, Duggleby CJ, Turnbull PC*. Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR J Syst Bacteriol 1996; 44: 99-105.
10. *Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY*. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *Bacillus cereus* strain from foods and food-borne outbreaks. J Appl Microbiol 1999; 87: 481-90.
11. *Keim P, Kalif A, Schupp J* i inni. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J Bacteriol 1997; 179: 2002-6.
12. *Koehler TM. Bacillus anthracis* Physiology and Genetics. Mol Aspects Med 2009; 30: 386-96.

13. *Lechner S, Mayr R, Francis KP* i inni. *Bacillus weihenstephanensis* sp.nov. is a new psychrotoleramt species of the *Bacillus cereus* group. Int J Syst Bacteriol 1998; 48: 1373-82.
14. *Lecadet MM, Frachon E, Cosmao Dumanoir V* i inni. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J Appl Microbiol 1999; 86: 660-672.
15. *Nakamura L*.K. *Bacillus pseudomycoides* sp.nov. Int J Syst Bacteriol 1998; 48: 1031-35
16. *Park SH, Kim HJ, Kim JH* i inni. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. J Microbiol Biotechnol 2007; 17: 1177-82.
17. *Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM*. i inni. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J 2011; 9: 283-300.
18. *SchneiderKR, Parish ME, Goodrich RM, Cookingham T. Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Florida Cooperative Extension Service, University of Florida. 2004. (www.edis.ifas.ufl.edu)
19. *Sergeev N, Distler M, Vargas M* i inni. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. J Microbiol Methods 2006; 65: 488-502.
20. *Stenfors LP, Mayr R, Scherer S, Granum PE*. Pathogenic potencial of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. FEMS Microbiol Lett 2002; 215: 47-51.

Otrzymano: 18 VI 2012 r.
Adres Autora: 00-791, Warszawa, ul. Chocimska 24,
Zakład Bakteriologii, NIZP-PZH
e-mail: kforminska@pzh.gov.pl