

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2016, 68: 5 - 11

Zastosowanie sekwencjonowania 16S rDNA
do identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*

Using of the 16S rDNA sequencing
for identification of *Lactobacillus* species

Anna Piotrowska¹, Tomasz Gosiewski¹, Małgorzata Bulanda², Monika Brzywczy-Włoch¹

¹Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Katedra Mikrobiologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

²Zakład Epidemiologii Zakażeń, Katedra Mikrobiologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią istotny składnik mikrobiomu człowieka, uczestnicząc na drodze wielu mechanizmów w jego obronie przed florą patogenną. Pomimo znaczenia bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jako probiotyków, wymagają one wciąż rozwijania technik ich identyfikacji. Sekwencjonowanie 16S rDNA stanowi alternatywę dla obecnie stosowanych metod dając wyniki o bardzo wysokiej czułości i swoistości.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus*, sekwencjonowanie 16S rDNA, molekularna identyfikacja gatunkowa

ABSTRACT

Introduction: Lactobacilli play an important role in maintaining vaginal health and protecting the genital tract from bacterial infections, so very often they are used as probiotics. Despite the scientific consensus on the significance of the genus *Lactobacillus*, its species identification still poses several difficulties. The aim of this study was to find out if the 16S rDNA sequencing method allows exact genotyping of *Lactobacillus* species.

Methods: 78 isolates from healthy pregnant women were tested: 57 from the vagina and 21 from the rectum. We also examined seven reference strains: *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 20052, *L. plantarum* ATCC 20174, *L. plantarum* ATCC 14431, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 20074, *L. crispatus* ATCC 20225 and *L. gasseri* ATCC 20243 to confirm the effectiveness of the sequencing method. A fragment of the 16S rDNA was amplified. After amplification, the amplicons were separated by gel electrophoresis and

then sequenced. Furthermore, the received consensus sequences were checked for species specificity in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database with BLAST software. Sequences with a $\geq 98\%$ match to a database sequence were considered to be the same species.

Results: We have confirmed the genus of seven tested reference strains of lactobacilli with 100% probability. Of the analyzed isolates, all were identified to the species level. 14 species were identified in the 78 respondents, 9 of which colonized the vagina and 11 appeared in the rectum. The species colonizing the vagina were: *L. gasseri* 31.6%, followed by *L. crispatus* 28.2%, *L. rhamnosus* 14%, *L. amylovorus* 14%, *L. helveticus* 3.5%, *L. reuteri* 3.5%, *L. casei* 1.7%, *L. salivarius* 1.7% and *L. delbrueckii* 1.7%. The species colonizing the anus were: *L. casei/ L. paracasei* 28.6%, *L. plantarum* 14.3%, *L. crispatus* 14.3%, *L. gasseri* 9.5%, *L. reuteri* 9.5%, *L. salivarius* 4.8%, *L. rhamnosus* 4.8%, *L. acidophilus* 4.8%, *L. ruminis* 4.8% and *L. sakei* 4.8%.

Conclusions: Using the 16S rDNA sequencing method made it possible to genotype 100% of the tested isolates of *Lactobacillus*.

Keywords: *Lactobacillus*, 16S rDNA sequencing, molecular species identification

WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to Gram-dodatnie laseczki, preferujące warunki mikroaerofilne lub bezwzględnie beztlenowe, wchodzące w skład mikrobiomu człowieka. Kolonizują dolny odcinek układu pokarmowego, pochwę oraz jamę ustną. Szczególnie istotną rolę odgrywają w drogach rodnych kobiet gdzie poprzez obniżenie pH, w wyniku syntezy kwasu mlekowego, chronią przed zakażeniem. Bakterie te produkują również bakteriostatyczne i bakteriobójcze substancje takie jak bakteriocyny oraz nadtlenuk wodoru (H_2O_2), przez co eliminują konkurencyjne gatunki w swoim środowisku (3, 18). Obniżenie miana bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przy jednoczesnym wzroście liczby chorobotwórczych beztlenowców takich jak *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp. czy *Atopobium vaginalis* stanowi główną przyczynę bakteryjnej wagiozy (ang. *bacterial vaginosis*, BV) (7, 10, 16). Zachowanie równowagi mikrobiologicznej pochwy jest najistotniejsze w profilaktyce bakteryjnej wagiozy, stąd stale rosnąca w ostatnich latach popularność preparatów farmaceutycznych i suplementów diety zawierających w swoim składzie szczepy probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* (14).

Dotychczas opisano ponad 180 gatunków z rodzaju *Lactobacillus* kolonizujących ludzki organizm, a skład gatunkowy różni się w zależności od miejsca ich bytowania. Do gatunków najczęściej izolowanych z pochwy należą *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* i *L. iners* (1, 6, 12, 19). Prowadzone w ostatnich latach niezależne badania wykazały różnice w składzie gatunkowym *Lactobacillus* mikroflory pochwy zdrowych kobiet w zależności od rasy i położenia geograficznego. Z badań tych wynika, że u zdrowych latynoszek i afroamerykanek bakterie z rodzaju *Lactobacillus* występują rzadziej niż u kobiet rasy białej (13, 20, 21).

Gatunkowy skład mikrobiologiczny pochwy zmienia się w poszczególnych okresach życia kobiety i uzależniony jest od zmian hormonalnych. Zmiany flory pochwy uzależnione są także od stosowania antybiotyków, terapii hormonalnej, doustnej antykoncepcji, ciąży, jak również występowania chorób podstawowych np. cukrzycy (20).

Obecnie stosowane metody do identyfikacji fenotypowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, oparte są głównie na komercyjnych zestawach biochemicznych np. test API 50CHL firmy Biomérieux. Testy tego typu są niejednokrotnie trudne w interpretacji, a przede wszystkim umożliwiają identyfikację jedynie kilku najczęściej izolowanych gatunków, często obciążoną błędem. W ostatnich latach odnotowuje się wyraźny wzrost popularności metod wykorzystujących techniki biologii molekularnej np. łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) (5, 10). Metoda PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla danego gatunku jest obecnie dostępna w wielu laboratoriach diagnostycznych, jednakże, istotnym ograniczeniem tej metody jest fakt, iż wymaga ona przedwstępnej identyfikacji składu analizowanego materiału, najczęściej przy zastosowaniu metod fenotypowych. Ponadto, podczas jednej reakcji PCR lub w odmianie multipleks możliwa jest analiza maksymalnie kilku gatunków w danej próbce, co ze względu na dużą liczbę gatunkową rodzaju *Lactobacillus* wymaga wykonania kilku niezależnych oznaczeń, w których niezbędne są próbki wzorcowe będące kontrolami pozytywnymi. Podnosi to istotnie koszt badania, wydłuża czas oznaczenia, a co najważniejsze nie wszystkie procedury dostępne są w fachowym piśmiennictwie.

W ostatnich latach bardzo popularne w diagnostyce mikrobiologicznej stały się metody spektrometryczne, ze szczególnym uwzględnieniem spektrometrii mas w tym metody MALDI (ang. *matrix assisted laser desorption and ionisation*). Metoda MALDI daje bardzo dobre wyniki, charakteryzujące się wysoką czułością i specyficznością (1). Jednakże wymaga wysoce wyspecjalizowanej aparatury dostępnej tylko w nielicznych jednostkach badawczych.

Alternatywą dla powyższych metod jest technika sekwencjonowania Sangera, obejmująca analizę konserwatywnej sekwencji 16S rybosomalnego DNA bakterii (17). Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością, a jej zastosowanie umożliwia uzyskanie jednoznacznych i powtarzalnych wyników na poziomie identyfikacji gatunkowej bakterii (1). W porównaniu do metody MALDI jest tańsza i prostsza w wykonaniu i nie wymaga tak drogiego sprzętu do jej przeprowadzenia, tym bardziej, że samo sekwencjonowanie produktu amplifikacji można zlecić laboratorium zewnętrznemu.

W związku z dużą liczbą gatunków *Lactobacillus* i faktem, iż ich identyfikacja wciąż przysparza wiele problemów, celem niniejszej pracy była ocena skuteczności zastosowania sekwencjonowania 16S rDNA metodą Sangera do identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 78 szczepów klinicznych z rodzaju *Lactobacillus* wchodzących w skład kolekcji własnej Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Badane szczepy zostały wyizolowane w 2010 roku z wymazów z pochwy (n=57) i odbytu (n=21) od zdrowych kobiet w wieku rozrodczym. Zostały one wstępnie zidentyfikowane na podstawie fenotypu: ze stałego podłoża MRS (de Man-Rogosa-Sharpe agar) izolowano pojedyncze kolonie wyhodowane w warunkach beztlenowych o morfologii *Lactobacillus*, które następnie klasyfikowano do rodzaju za pomocą testu API 20A (bioMérieux). Dodatkowo badaniu poddano szczepy referencyjne reprezentujące następujące gatunki: *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 20052, *L. plantarum* ATCC 20174,

L. plantarum ATCC 14431, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 20074, *L. crispatus* ATCC 20225 oraz *L. gasseri* ATCC 20243. Szczepy bakteryjne przechowywano w -70°C . W celu ich ożywienia prowadzono hodowlę na stałym podłożu MRS w 37°C przez 48 godzin w środowisku beztlenowym (GasBox). Następnie szczepy hodowano w 3 ml płynnego podłoża MRS w 37°C przez 24 godziny w warunkach beztlenowych. Izolację bakteryjnego DNA prowadzono przy zastosowaniu komercyjnego zestawu GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) według procedury opracowanej przez producenta z dodatkiem 3,5 μl mutanolizyny (Sigma Aldrich) i 7 μl lizozymu (Sigma Andrich). Stężenie i czystość wyizolowanego DNA oceniono przy użyciu aparatu NanoDrop (Thermo Scientific). Amplifikacji bakteryjnego materiału genetycznego dokonano przy użyciu uniwersalnej pary starterów TP16U1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) i RT16U6 (ATTGTAGCACGTGTGTN-GCCC) (Genomed) o stężeniu 0,3 μM (1). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło także 25 μl komercyjnej mieszaniny 2xPCR Master Mix RAPID (A&A Biotechnology), 17 μl wody wolnej od RNAz (A&A Biotechnology) oraz 2 μl DNA bakteryjnego. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze T100 Thermal Cycler (BioRad) według programu: wstępna denaturacja w 94°C przez 2 min poprzedzająca powtarzane 25 razy cykle: 1 min. denaturacja w 92°C , 1 min. przyłączanie starterów w 55°C i 1,5 min. elongacja w 72°C zakończona 5 min. końcowym wydłużaniem. Po zakończeniu reakcji PCR produkt amplifikacji poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1,5% żelu agarozowym (Prona ABO) w 1x buforze TBE (Sigma Aldrich) z dodatkiem bromku etydyny (Sigma Aldrich), przez 60 min. przy napięciu 5V/cm. Wyniki rozdzielania elektroforetycznego dokumentowano z użyciem aparatu Gel Doc 2000 (BioRad) w obecności światła UV. Produkty amplifikacji o wielkości 1233 pz poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera (Genomed). Następnie przy pomocy oprogramowania ChromasPro ver 1.7 (Technelysium Pty Ltd), wygenerowano sekwencję konsensusu, którą wprowadzono do bazy NCBI (ang. *National Center of Biotechnology Information Database with BLAST software*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), celem identyfikacji gatunku bakterii. Wynik analizy uznano za pozytywny, jeśli podobieństwo wprowadzonej do bazy sekwencji wyniosło $\geq 98\%$ wobec sekwencji zamieszczonych w bazie danych BLAST.

WYNIKI

Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania metodą Sangera konserwatywnej sekwencji 16S rybosomalnego DNA dla wszystkich badanych szczepów referencyjnych z rodzaju *Lactobacillus* potwierdzono ich przynależność gatunkową ze 100% prawdopodobieństwem. Pozytywny wynik identyfikacji uzyskano także dla wszystkich badanych izolatów klinicznych. Ogółem na 78 szczepów zidentyfikowano 14 gatunków z rodzaju *Lactobacillus*, z czego 9 gatunków oznaczono dla izolatów pochodzących z pochwy, a 11 z odbytu. Gatunkiem najczęściej izolowanym wśród szczepów pochwowych był *L. gasseri* 31,6% (n=18), następnie *L. crispatus* 28,2% (n=16), *L. rhamnosus* 14% (n=8), *L. amylovorus* 14% (n=8), *L. helveticus* 3,5% (n=2), *L. reuteri* 3,5% (n=2), *L. casei* 1,7% (n=1), *L. salivarius* 1,7% (n=1), *L. delbrueckii* 1,7% (n=1). Gatunkami najczęściej występującymi w próbkach z odbytu były: *L. casei*/ *L. paracasei* 28,6% (n=6), następnie *L. plantarum* 14,3% (n=3), *L. crispatus* 14,3% (n=3), *L. gasseri* 9,5% (n=2), *L. reuteri* 9,5% (n=2), *L. salivarius* 4,8% (n=1), *L. rhamnosus* 4,8% (n=1), *L. acidophilus* 4,8% (n=1), *L. ruminis* 4,8% (n=1) oraz *L. sakei* 4,8% (n=1).

DYSKUSJA

Rodzaj *Lactobacillus* charakteryzuje się dużą liczbą gatunków, które kolonizują organizm człowieka, a ich skład zmienia się w zależności od wieku, płci, chorób podstawowych, stosowanych leków, rasy, a także szerokości geograficznej (7). Obecnie stosowane metody fenotypowe, obejmujące analizę reakcji biochemicznych są niewystarczające, czasochłonne i kosztowne. Dlatego istotne jest opracowanie metody molekularnej umożliwiającej szybką i skuteczną identyfikację gatunkową w obrębie rodzaju *Lactobacillus*, która będzie możliwa do powszechnego zastosowania.

W niniejszej pracy potwierdzono skuteczność zastosowania sekwencjonowania konserwatywnej sekwencji 16S rybosomalnego DNA bakterii metodą Sangera do identyfikacji gatunkowej *Lactobacillus*. Dzięki tej metodzie w jednoznaczny sposób potwierdzono przynależność gatunkową 7 szczepów referencyjnych. Ponadto, przeprowadzono identyfikację gatunkową wszystkich 78 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z pochwy i odbytu kobiet w wieku rozrodczym.

W prezentowanej pracy wykazano, że skład gatunkowy izolatów z odbytu charakteryzował się większym zróżnicowaniem niż w przypadku izolatów z dróg rodnych. Zastosowanie tej metody przyniosło porównywalne wyniki do wyników opisanych przez Anderson i wsp., którzy wykazali obecność 15 różnych gatunków z rodzaju *Lactobacillus* kolonizujących pochwę (1). Według danych literaturowych gatunkami najczęściej kolonizującymi pochwę zdrowych kobiet są *L. crispatus*, *L. jensenii* i *L. gasseri* (14). Uzyskane przez nas wyniki pokrywają się z tymi danymi, gdyż w badanej puli izolatów wykazano dominację dwóch gatunków *L. gasseri* (31,6%) i *L. crispatus* (24,6%). Podobne wyniki opisał także zespół Pendharkar'a badający mikrobiom kobiet zamieszkujących RPA, który wykazał dominację *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri* i *L. vaginalis* (16).

Metoda sekwencjonowania Sangera znalazła również zastosowanie w identyfikacji gatunków z rodzaju *Lactobacillus* kolonizujących jamę ustną (1, 4), jak i w przemyśle spożywczym, ze szczególnym uwzględnieniem typowania gatunków odpowiedzialnych za fermentację produktów mlecznych (11). Ponadto, wykorzystanie techniki sekwencjonowania 16S rybosomalnego DNA umożliwiło oznaczenie nowych gatunków, tak jak to miało miejsce w przypadku *L. iners* (9).

Zgodnie z danymi literaturowymi, zastosowanie metody sekwencjonowania konserwatywnej sekwencji 16S rybosomalnego DNA umożliwia jednoznaczne rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków. Przykładem może być grupa 6 gatunków wykazujących wysoką homologię DNA: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. johnsonii*, których identyfikacja nie byłaby możliwa przy wykorzystaniu standardowych testów fenotypowych (19). Jednakże, podobnie jak w pracy Anderson i wsp. (1), w naszych badaniach nie udało się jednoznacznie rozróżnić, bardzo blisko spokrewnionych ze sobą, gatunków *L. paracasei* i *L. casei*.

W swoich badaniach Anderson i wsp. (1), porównując skuteczność sekwencjonowania 16S rDNA z techniką spektrometrii mas typu MALDI w oznaczaniu gatunków *Lactobacillus*, wykazała bardzo wysokie, bo aż 96% podobieństwo uzyskanych wyników stosując obydwie metody. Wyniki te zostały potwierdzone także przez Callaway'a i wsp. (5) i Angelakis'a i wsp. (2). Wykazano tym samym, że wykorzystanie alternatywnej metody sekwencjonowania fragmentu 16S rybosomalnego DNA umożliwia uzyskanie wiary-

godnych wyników, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów i skróceniu czasu oczekiwania na wyniki, co w konsekwencji może przełożyć się na poprawę jakości diagnostyki mikrobiologicznej. Poszerzenie zakresu niniejszej metody o identyfikację innych gatunków wchodzących w skład mikrobiomu człowieka lub izolowanych z zakażeń może przynieść wymierne efekty w podniesieniu jakości usług w polskich szpitalach i innych jednostkach medycznych.

PIŚMIENNICTWO

1. *Anderson AC, Sanunu M, Schneider C* i inni. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol* 2014; 14: 312.
2. *Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D*. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Food Sci* 2011; 76: 568–72.
3. *Bodaszewska-Lubas M, Brzywczy-Wloch M, Gosiewski T, Heczko PB*. Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins-pilot study. *Postępy Hig Med Dosw* 2012; 25: 787–94.
4. *Byun R, Nadkarni MA, Chhour K* i inni. Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3128–36.
5. *Callaway A, Kostrzewa M, Willershause B* i inni. Identification of lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab* 2013; 59: 1373–9.
6. *Cherpes TL, Hillier SL, Meyn LA* i inni. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2008; 35: 78–83.
7. *Donders GG*. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 355–73.
8. *Dušková M, Šedo O, Kšicová K* i inni. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol* 2012; 159: 107–14.
9. *Falsen E, Pascual C, Sjöden B* i inni. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 217–21.
10. *Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM*. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1899–911.
11. *Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS* i inni. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J Dairy Sci* 2015; 98: 3622–32.
12. *Linhares IM, Giraldo PC, Baracat EC*. New findings about vaginal bacterial flora. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 370–4.
13. *Ma B, Forney LJ, Ravel J*. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 371–9.
14. *Mastromarino P, Vitali B, Mosca L*. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol* 2013; 36: 229–38.
15. *Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS* i inni. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 451–9.
16. *Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG* i inni. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 43.
17. *Sanger F, Nicklen S, Coulson AR*. DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. *Biochemistry* 1977; 74: 5463–7.

18. Strus M, Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Kochan P, Heczko PB. The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 48: 56–63.
19. Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S i inni. Vaginal *Lactobacillus* biota of healthy Swedish women. J Clin Microbiol 2002; 40: 2746–9.
20. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG i inni. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology 2004; 150: 2565–73.
21. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z i inni. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. Isme J 2007; 1: 121–33.

Otrzymano: 28 IX 2015

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysza 18, Katedra Mikrobiologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medium
e-mail: mbrzych@cm-uj.krakow.pl