

# Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis

Øyvind Kommedal, Katrine Lekang, Nina Langeland and Harald G. Wiker

Journal of Medical Microbiology (2011), 60, 927–936

## Methodische Vorbemerkung

Aktuelle Methode Eubakterielle PCR (= Bakterielle Breitband PCR):

Direkte PCR Amplifikation eines Teils des 16S rRNA Gens mit universellen Primern aus klinischen Proben:

falls pos. nach Agarosegelelektrophorese, Sequenzierung und Vergleich mit Referenzsequenzen in Datenbank. Bei einem Gemisch bakterieller DNA nach Sequenzierung: keine Genus oder Spezies-Aussage möglich

Methoden zum Nachweis von Gemischen bakterieller DNA:

- Hybridisierung mit Spezies- oder Genus-spezifischen Sonden (heute mit Array-Format)
- Subklonieren in Vektor und anschliessend Sequenzieren der Klone
- in-silico Analyse der Mischchromatogramme (nach Sequenzierung) mit spezieller Software (Programm RipSeq Mixed): Nachweis von bis zu 3 Spezies.



## Einleitung

Die bakterielle Breitband PCR ist ein wertvolles Werkzeug zum direkten, kulturunabhängigen Nachweis von bakteriellen Erregern aus klinischen Materialien.

Mit der Anwendung einer neuartigen Web-basierten Software (RipSeq Mixed) können bis zu 3 Bakterienspezies aus einem Gemisch detektiert werden.

Beim Nachweis von Mischinfektionen aus Abszessen und Empyemen ist die Methode der einzelnen PCR Reaktion aber wegen der hohen Anzahl der Erreger limitiert. Bakterien, die in kleinerer Menge vorhanden sind, könnten dadurch nicht nachgewiesen werden. Ausserdem können nur bis zu 3 Erreger nachgewiesen werden.

Entwicklung von 3 Gruppen-spezifischen PCRs und Anwendung dieser neuen Methode an 25 polymikrobiellen und 25 negativen klinischen Proben und Vergleich mit Kultur und der Einzel-PCR mit RipSeq Mixed.

## Material und Methoden

### Design der 3 Gruppen-spezifische PCR

jeweils unterschiedlicher Forward-Primer und identischer Reverse-Primer (Erster Drittel des 16S rRNA-Gens, ca. 500bp):

Gruppe A: Gram-positive Kokken in Ketten und einige Anaerobier (42 Genera)

Gruppe B: Gram-negative Bakterien (46 Genera)

Gruppe C: Staphylococcus spec. und Anaerobier (41 Genera)

Verwendung von LNA-Nukleotiden beim Design der Forward Primer, um hohe Spezifität zu erzielen.

**Real-time PCR** mit SybrGreen und 40 Zyklen auf SmartCycler (Cepheid) , Totalvolumen 25µl, Volumen Probenextrakt 2µl.

Negativkontrollen: Extraktions- und Amplifikationskontrollen

Cut-off positiv: 3 oder mehr Zyklen bevor Negativkontrolle positiv.

### Sequenzierung

Cycle Sequencing mit speziellem Sequenzierprimer nur in Reverse-Richtung.

### Bestimmung der Kreuzreaktivität der 3 verschiedenen Primer

Verdünnungsreihen mit entsprechender bakterieller Ziel-DNA resp. Nicht-Ziel-DNA in unterschiedlicher Zusammensetzung (1:1 bis 1:1000), aber auch humaner DNA.

### Klinische Proben

25 polymikrobielle klinische Proben: 17 Abszess-Materialien, 6 Emyeme, 2 Galle.

25 negative Proben

### Interpretation der Chromatogramme

Anwendung der RipSeq Mixed Software (ca. 1500 Referenzsequenzen)

## Uebersicht der molekularen Nachweismethoden



## Resultate

### Kreuzreaktivität

Tendenz für Kreuzreaktivität bei PCR A mit bakt. DNA der Gruppe C und zwischen

PCR C mit bakt. DNA der Gruppe A.

Keine Interferenz mit humaner DNA.

### Klinische Proben

Alle 25 polybakteriellen Proben zeigten eine grosse Menge bakterieller DNA an.

Total nachgewiesene Spezies in diesen 25 Proben:

Kultur: 37 Spezies

Standard PCR: 51 Spezies

Gruppen PCR: 95 Spezies  
Siehe Tabelle 2

Alle Bakterien in Standard PCR nachgewiesen, auch in Gruppen PCR nachgewiesen.

In 6 Proben Ergebnis Standard / Gruppen PCR identisch  
In restlichen 19 Proben wurde mit Gruppen PCR total 44 zusätzliche Spezies detektiert.

Nur 32 der 95 Spezies waren kultivierbar.

25 Negative klinische Proben  
Nur 2 Pos. Signale in insgesamt 100 PCR Reaktionen (1 Standard PCR, 1 Gruppen PCR)

### **Diskussion**

Signifikante Erhöhung der Nachweisrate mit der Gruppen-PCR im Vergleich zum Standardverfahren mit RipSeq Mixed (95 gegenüber 51)

Hohe Spezifität der neuen Primer mit Verwendung von LNA-Nukleotiden.

recht gute Verteilung der nachgewiesenen Erreger auf die 3 Gruppen: Gruppe A: 42 Spezies,  
Gruppe b: 20 Spezies und Gruppe C 33 Spezies

Leicht erhöhte Kosten der Analyse 3 Sequenzierreaktionen an Stelle von 1 Sequenzierreaktion.

Vorschlag Einsatz Standard PCR / Gruppen PCR:  
Standard PCR bei z.B. Liquor oder Gelenkspunktat  
Gruppen PCR: bei Abszessen, Empyem.

Gute Uebereinstimmung der Resultate mit anderer Studie (Al Masalma et al, 2009) bei der Untersuchung von Hirnabszessen mit anderer Methode (Klonierung und Sequenzierung)

Bessere Charakterisierung der Erreger in polybakteriellen klinischen Proben  
Methodik kann relativ einfach in klinischem Labor eingeführt werden, das Erfahrung hat mit konventioneller bakterieller Breitband-PCR.

### **Bemerkungen**

Erstaunliche Ausbeute der Gruppen-PCR

Kein Vergleich mit anderer molekularer Nachweismethode (z.B. Subklonierung)

Im Vergleich zur Kultur sehr rasch durchführbar

Keine Aussage über Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode