



## Doctoral Thesis

# Detection of bacterial pathogens in clinical specimens by broad-range PCR amplification and direct sequencing of part of the 16S rRNA gene

**Author(s):**

Goldenberger, Daniel

**Publication Date:**

1997

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001794127> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 12219

**Detection of bacterial pathogens in  
clinical specimens by broad-range  
PCR amplification and direct sequencing  
of part of the 16S rRNA gene**

Thesis

submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH (ETHZ)

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

by

DANIEL GOLDENBERGER

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born on October 22, 1962

of Schmiedrued (AG)



accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner and  
Prof. Dr. Martin Altwegg, co-examiner

Zürich 1997

---

**ABSTRACT**

The modification and use of a new DNA-based method („broad-range“ or „eubacterial PCR“) with the potential to detect uncultured including as yet unknown bacterial pathogens directly from clinical specimens is reported in the form of original publications. The method combines the very powerful polymerase chain reaction (PCR) amplification technique with the broad-range approach targeting conserved regions of the 16S ribosomal RNA genes.

Our modified methodology includes a simple „universal“ DNA extraction procedure using sodium dodecyl sulfate (SDS) and proteinase K made compatible with direct PCR amplification by heat treatment and addition of Tween 20 to the amplification mix. It also includes the use of dUTP instead of dTTP and of uracil-N-glycosylase (UNG) to prevent false positives due to amplicon carry-over. By using pure cultures, the sensitivity of broad-range PCR combined with the simple DNA extraction protocol was between 7 (*Escherichia coli*) and 600 (*Staphylococcus aureus*) organisms per amplification as determined on ethidium bromide-stained agarose gels. Furthermore, measures to significantly reduce contaminations from reagents used for amplification were developed. Rather than enzymes, primer preparations have been identified as potential source of these contaminations. PCR reagents (including primers but without enzymes) were exposed to UV light to destroy DNA. Amplified fragments were then characterized by semi-nested reamplification followed by strand separation and single-strand sequencing using an automated sequencer. Broad-range PCR and direct sequencing applied directly to clinical specimens proved to be a powerful tool which made the following results possible.

(1) The first reported case of spondylodiscitis due by *Tropheryma whippelii*, the bacillus causing Whipple's disease, is described. The presence of this organism in the affected vertebral body was proven by species-specific PCR, and the same agent was also detected in bowel biopsies by species-specific PCR and by conventional histologic methods (periodic acid Schiff [PAS] staining), thus confirming the diagnosis of Whipple's disease.

(2) Eighteen resected heart valves from patients with bacterial endocarditis were examined by broad-range PCR. Molecular results were compared with conventional bacteriological findings from heart valves and previous blood cultures. A strong correlation between molecular and culture results was found. In two patients with true culture-negative

endocarditis (i.e., negative blood cultures and valve cultures), DNA of *T. whippelii* and *Streptococcus* sp., probably *S. sanguis*, respectively, were identified on the aortic valves.

(3) In a large-scale study, 220 synovial specimens of 90 patients with arthritis were screened with molecular methods. The findings of species-specific PCR targeting bacteria known to be associated with arthritis (*Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *C. pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae*) and of broad-range PCR were compared with conventional bacteriological results. In 6 patients *B. burgdorferi* DNA was detected and, again, one patient was positive for *T. whippelii* in the synovial fluid. Species-specific PCR proved to be more sensitive than broad-range PCR and sequencing.

(4) One case of a lethal maternal sepsis due to *Campylobacter jejuni/coli* is documented. Specific bacterial DNA from formalin-fixed placental tissue was detected by use of broad-range PCR and sequencing, confirming microscopic findings and previous stool cultures.

(5) The identification of two 16S rRNA variants of *Bartonella henselae* (which causes bacillary angiomatosis and cat scratch disease) led to epidemiologic studies examining 34 human specimens and 19 strains isolated from cats.

Broad-range PCR amplification followed by direct sequencing of part of the 16S rRNA genes applied directly to clinical specimens proved to be a very useful complementation of conventional clinical bacteriology. It allows the rapid detection of fastidious and not culturable bacteria and a broad search for all kinds of organisms, with the potential to detect and to characterize new bacterial agents. It must be stressed, however, that this methodology is extremely sensitive to contamination which mainly originates from reagents used for the amplification mix and for DNA extraction.

## KURZFASSUNG

### **Nachweis von bakteriellen Erregern aus klinischen Proben mit Hilfe der „Breitspektrum-PCR“-Amplifizierung und des direkten Sequenzierens eines Teils des 16S rRNA Gens**

Eine neue, auf dem Nachweis von DNA beruhende Methode wurde modifiziert und auf klinische Materialien angewendet. Mit diesem Verfahren ist es möglich, nicht kultivierbare und bisher unbekannte bakterielle Erreger nachzuweisen. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt unter Verwendung von gegen konservierte Regionen der 16S rRNA Gene gerichteten Primern mit hoher Sensitivität und auf breiter Basis die Suche nach bakteriellen Krankheitserregern (Breitspektrum-PCR, „eubakterielle“ PCR). Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden in Form einzelner Publikationen dargestellt.

Als Teil dieser Methode wurde eine einfach durchzuführende DNA-Extraktion entwickelt, die nach Freisetzung der DNA mit SDS und Proteinase K die direkte PCR-Amplifikation erlaubt. Dieses Verfahren schliesst die Verwendung von Uracil-N-Glykosylase (UNG) zur Verhinderung von falsch-positiven Resultaten in Folge von Labor-kontaminationen ein. Mit Bakterienreinkulturen und der neu entwickelten DNA-Extraktion wurde die Sensitivität der Breitspektrum PCR evaluiert. Diese lag zwischen 7 (*Escherichia coli*) und 600 (*Staphylococcus aureus*) nachgewiesenen Organismen pro Amplifikation, gemessen auf Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen. Im weiteren wurden Massnahmen getroffen, um Reagentienkontaminationen stark vermindern zu können. Diese wurden nicht etwa in den für die PCR verwendeten Enzymen sondern vorwiegend in den Primerlösungen gefunden. Die PCR-Reagenzien (inkl. Primer aber ohne Enzyme) wurden daher mit UV-Licht bestrahlt. Dies führte zu einer effizienten aber nicht ganz vollständigen Zerstörung der kontaminierenden DNA. In einem weiteren Schritt konnte das PCR-Produkt mit einem einfachen Sequenzierungsprotokoll identifiziert werden: Die PCR-Produkte wurden „semi-nested“ reamplifiziert, danach erfolgten Strangtrennung und Einzelstrang-Sequenzierung mit Hilfe eines automatisierten Sequenziergerätes.

Die Anwendung der Breitspektrum-PCR mit anschliessender Sequenzierung an klinischen Materialien erwies sich als sehr erfolgreich. Dadurch wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

1) Der erste dokumentierte Fall einer durch den Erreger der Whipple-Krankheit, *Tropheryma whippelii*, verursachten Spondylodiszitis konnte dargestellt werden. Nachdem der Erreger im betroffenen Wirbelkörper entdeckt wurde, konnte das Agens in Darmbiopsien sowohl mit Hilfe der speziesspezifischen PCR als auch mit konventionellen histologischen Methoden nachgewiesen werden (Periodsäure-Schiff [PAS]-Färbung).

2) Die entfernten Herzklappen von 18 Patienten mit bakterieller Endokarditis wurden mit der Breitspektrum-PCR untersucht. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit jenen der bakteriologischen Untersuchungen von den Herzklappen wie auch der vor der Operation durchgeführten Blutkulturen wurde eine gute Übereinstimmung festgestellt. Bei zwei Patienten mit Kultur-negativen Endokarditiden (sowohl Blutkulturen wie auch Kulturen der Herzklappen zeigten kein Wachstum) wurde DNA von *T. whippelii* respektive von *Streptococcus* sp., wahrscheinlich *S. sanguis*, jeweils aus der Aortenklappe nachgewiesen.

3) In einer grossen Studie wurden 220 Gelenkproben von Patienten mit Arthritis mit molekularen Methoden untersucht. Sowohl die gegen bekannte bakterielle Arthritis-erreger gerichteten PCR-Amplifikationen (*Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *C. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) als auch die Breitspektrum-PCR wurden mit den konventionellen Methoden wie Mikroskopie und Kultur verglichen. Bei 6 Patienten konnte *B. burgdorferi*-DNA nachgewiesen werden und ein Patient war wiederum positiv für *T. whippelii*. *T. whippelii* wurde in Synovialflüssigkeit des Knies nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die speziesspezifische PCR der Breitspektrum-PCR in der Sensitivität überlegen ist.

4) Es wird der Fall einer Schwangeren mit sowohl für das Kind als auch für die Mutter letal verlaufenen Sepsis beschrieben, die durch *Campylobacter jejuni/coli* verursacht wurde. *Campylobacter*-DNA konnte aus mit Formalin fixiertem Plazentagewebe dargestellt werden. Dieser Befund bestätigte die mikroskopischen Ergebnisse wie auch vorhergehende Stuhlkulturen.

5) Die Identifizierung von zwei verschiedenen 16S rRNA Sequenztypen von *Bartonella henselae* (Erreger der bazillären Angiomatose und der Katzenkratzkrankheit) ermöglichte epidemiologische Untersuchungen an 34 humanen Proben wie auch an 19 aus Katzen isolierten Stämmen.

Es zeigte sich, dass die Breitspektrum-PCR mit anschliessender Sequenzierung eine ausserordentlich nützliche Ergänzungsmethode zu konventionellen bakteriologischen Methoden darstellt. Sie erlaubt den schnellen Nachweis von anspruchsvollen und nicht

---

kultivierbaren Bakterien. Darüber hinaus kann mit diesem Ansatz unspezifisch nach Bakterien irgendwelcher Art gesucht werden. Diese Methode hat dadurch das Potential, neue bakterielle Krankheitserreger entdecken und charakterisieren zu können. Es muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass diese Methode extrem anfällig ist für Kontaminationen, welche oft aus Reagenzien stammen, die für den PCR-Mix oder die DNA-Extraktion verwendet werden.