

**Joanna Malgorzata Bivand**

Bioingeniør, MSc og ph.d.-stipendiat ved Mikrobiologisk avdeling, Haukeland universitetssjukehus og Klinisk Institutt 2, Universitet i Bergen.  
E-post: joanna.malgorzata.bivand@helse-bergen.no

**Øyvind Kommedal**

Ph.d., seksjonsoverlege ved molekylærbiologisk seksjon, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland universitetssjukehus.

# Et nytt verktøy for identifisering av bakterier

**Genet *rpoB* har et stort potensial til å forbedre identifisering av bakterier. Resultatene fra denne studien viser at sekvensering av *rpoB* skiller bedre mellom nært beslektede arter enn 16S rRNA-genet.**

16S rRNA-genet har vært brukt som fylogenetisk markør og til identifisering av bakterier siden 1970-tallet. Selv om man i dagens laboratorier hovedsakelig bruker MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) til identifisering av bakterier, så finner man jevnlig isolater som ikke lar seg sikkert artsbestemme. I slike tilfel-

ler kan man benytte seg av sekvensering av det bakterielle 16S rRNA-genet. I tillegg brukes amplifikasjon og Sanger-sekvensering av 16S rRNA-genet som dyrkningsuavhengig diagnostikk direkte fra prøvematerialet. Denne direkte 16S-sekvenseringen har noen svakheter, blant annet at genet kan forekomme i mange kopier med variert sekvens. Det kan føre til sekvenseringsresultater som er vanskelige å tolke. I tillegg har 16S rRNA-genet lav mutasjonsrate, noe som gjør det vanskelig å skille mellom mange nært beslektede og klinisk relevante arter. Det bakterielle *rpoB*-genet forekommer i kun én kopi per bakteriecelle og har en vesentlig høyere mutasjonsrate, noe som gir bedre muligheter for å skille mellom ulike arter. *rpoB* har tidligere blitt foreslått som mulig kandidat for identifisering av bakterier, men ingen har klart å designe universelle *rpoB*-primere. I denne studien har vi utviklet nettopp slike primere, og har undersøkt amplifikasjon og sekvensering av *rpoB*-genfragmentet som et alternativ til 16S rRNA-genet.

## Metode og sentrale funn

Basert på et bredt utvalg av referansegenomer fra NCBI-databasen, designet vi bredspektrede *rpoB*-primere ved bruk av et såkalt DPO-design (dual-priming oligonucleotide). Denne metoden begrenser kryssreaktivitet mot humant DNA til et lavt nivå, selv om pri-

merne inneholder en rekke degenererte baser.

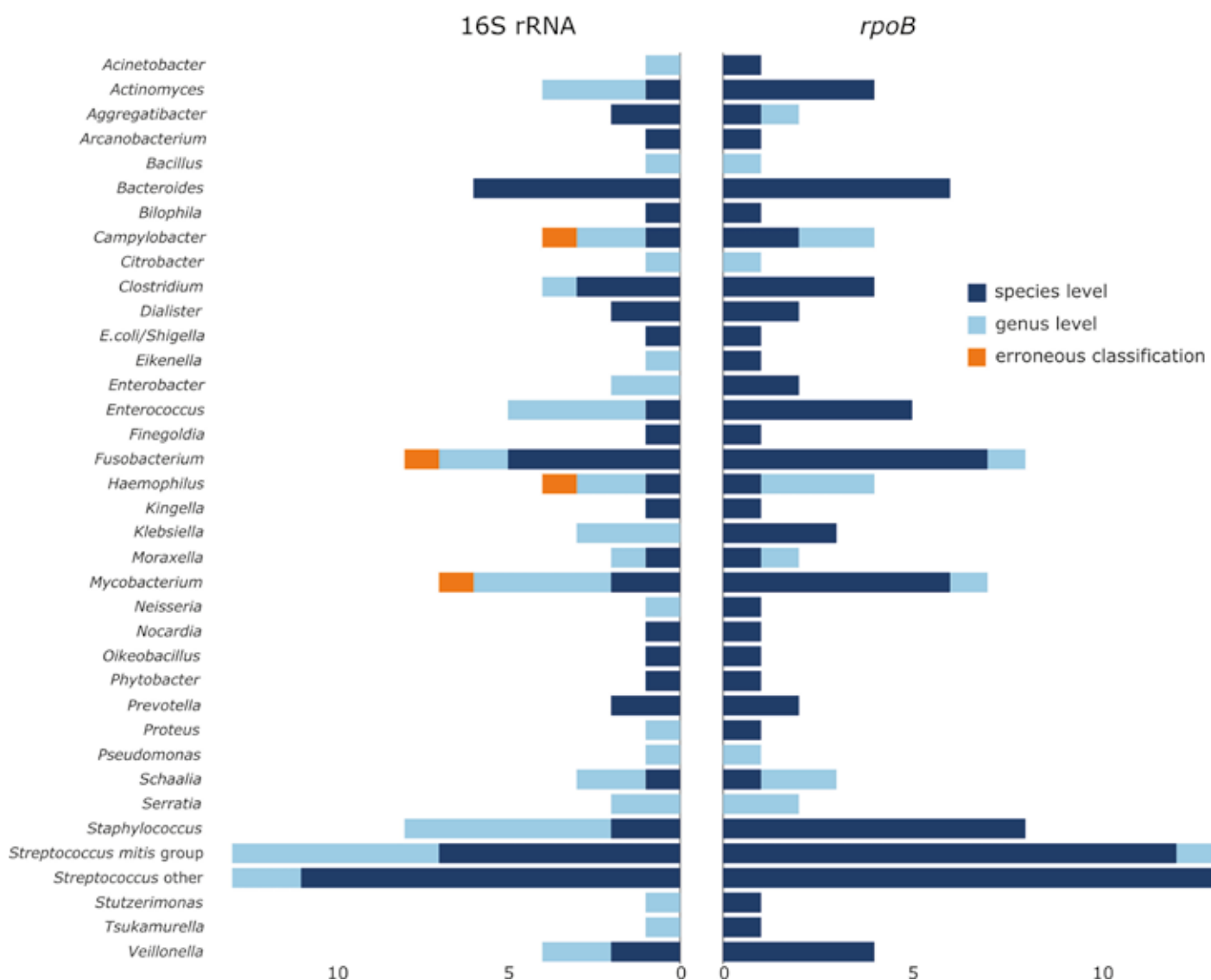
Vi gjennomførte bred *in silico*-analyse av det amplifiserte 550 bp lange *rpoB*-genfragmentet, og analyserte 39 klinisk relevante bakterieslekter. Vi sammenlignet *rpoB*-genfragmentet med typestammer og andre referanser av høy kvalitet for å vurdere variasjonen mellom arter og genetisk avstand til neste art. Denne analysen viste at *rpoB* er egnet til å skille mellom nært beslektede bakterier, for eksempel innenfor slektene *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium* og noen av slektene i *Enterobacteriaceae*-familien.

Videre sekvenserte vi *rpoB*- og 16S rRNA-genet fra 115 bakterieisolater (figur 1), som representerte 95 forskjellige arter fra 36 slekter. Bakterieisolatene ble valgt ut på bakgrunn av klinisk relevans eller fordi de er utfordrende å identifisere med 16S rRNA-genet. Alle isolatene ble først dyrket og analysert med MALDI-TOF. Med *rpoB* klarte vi å identifisere 84% av bakteriene til artsnivå, noe som var betydelig flere enn med 16S rRNA-genet (50%). PCR for *rpoB* var mindre effektiv enn vår 16S rRNA-PCR, og ga generelt høyere Ct-verdier. Dette hadde imidlertid ingen konsekvenser for identifisering fra bakteriekolonier, der man har rikelig med bakterielt DNA.

Til slutt evaluerte vi den *rpoB*-baserte metoden for dyrkningsuavhengig identifisering av bakterier direkte fra prøve-

## Om studien

■ Denne studien ble utført av ph.d.-stipendiat Joanna Malgorzata Bivand, som en del av doktorgrads-prosjektet hennes, i samarbeid med flere fra Mikrobiologisk avdeling på Haukeland universitetssjukehus. Studien er finansiert av forskningsmidler fra Helse Bergen. Artikkelen ble publisert i *Journal of Clinical Microbiology* i juni 2024 (1).



**FIGUR 1:** Resultater fra 16S rRNA- og *rpoB*-amplifikasjon og Sanger-sekvensering av 115 bakterieisolater. Fargene indikerer taksonomisk klassifiseringsnivå; art/species (mørkeblå), slekt/genus (lyseblå) og feilklassiferte (oransje). Tallene under figuren indikerer antall inkluderte isolater fra hver slekt/slektsgruppe. Figuren er hentet fra (1)(CC-BY 4.0).

materiale på 33 pasientprøver. Som forventet resulterte den lavere PCR-effektiviteten i en litt lavere sensitivitet, men metoden ga positivt utslag for 88%, og artsidentitet for 91% av disse. Til sammenligning hadde 16S rRNA-metoden en sensitivitet på 100%, men ga artsidentitet bare for 52% av dem.

### Konklusjon og betydning for fagfeltet

I denne studien presenterte vi den første universelle PCR-amplifikasjonen av det

bakterielle *rpoB*-genet. Det amplifiserte *rpoB*-fragmentet gjør det mulig å identifisere mikrober med høyere oppløsning enn 16S rRNA-genet, og metoden kan enkelt implementeres i mikrobiologiske laboratorier. *rpoB*-metoden egner seg også til bakterieidentifisering direkte fra pasientprøver, men på grunn av en lavere sensitivitet anbefaler vi den som et supplement og ikke som en erstatning for direkte 16S-sekvensering. ■

### Referanse:

1. Bivand JM, Dyrhovden R, Sivertsen A, Tellevik MG, Patel R, Kommedal Ø. Broad-range amplification and sequencing of the *rpoB* gene: a novel assay for bacterial identification in clinical microbiology. *J Clin Microbiol*. 2024;62(7):e0026624.