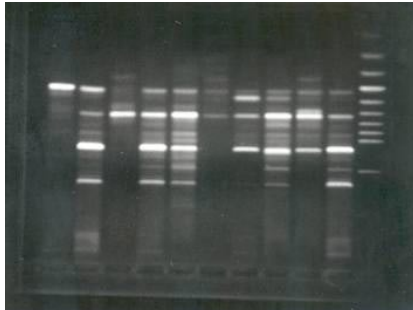


DNA-teknik underlättar epidemiologisk typning



RAPD; från isolat på agarplatta till bandmönster på en agarosgel där olika stammar ger olika "fingerprints".

Av Sandra Bergstrand, Helena Enroth, Klinisk mikrobiologi, Skövde

RAPD-analys av bakteriestammar är en molekylärbiologisk analys för epidemiologisk typning av bakteriestammar vid misstanke om utbrott.

Genom att jämföra RAPD mönstret hos stam isolerad från en patient med stam från en annan patient kan man t.ex. avgöra om det rör sig om en gemensam smittkälla.

Arbiträr amplifiering av polymorfa DNA sekvenser kallas för RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) eller AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR).

Snabb metod

Jämfört med fenotypiska typningsmetoder eller PFGE är metoden snabb, förhållandevis billig och tekniskt inte så avancerad för att användas vid epidemiologisk typning.

Den här tekniken ger dock en något lägre reproducerbarhet inom och framförallt mellan laboratorier än mer traditionella metoder.

För sjukhusepidemiologiska utredningar bör alla isolat jämföras vid samma analystillfälle, d.v.s. nya isolat skall ej jämföras med tidigare erhållna bandmönster.

Den här typen av repetitiva DNA-

element är vanligt förekommande i genomen hos många mikroorganismer och kan användas för att identifiera och särskilja arter och stammar med hjälp av de bandmönster/fingeravtryck som varje art eller stam genererar. Detta bandmönster kan sedan användas vid jämförelser mellan stammar vid t.ex. ett utbrott.

Repetitive Extragenic Palindromic (REP) elements och Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences återfinns hos många eubakterier, framförallt hos gram-negativa enterobakterier och närbesläktade arter.

Hos många gram-positiva bakterier återfinns en annan repetitiv DNA-sekvens, BOX element, först funna hos *Streptococcus pneumoniae*. BOX-elementen består av varierande kombinationer av 3 subenheter, boxA, boxB och boxC. Subenheten boxA verkar vara konserverad hos ett antal olika bakteriearter medan de två övriga subenheterna återfinns bara hos *S. pneumoniae*. AP-1, arbitrary primer (19-mer oligonukleotid) har använts för gramnegativa bakterier, t ex *H. pylori*.

Analysprincip för RAPD med PCR

Bakterierna odlas på agarplatta varifrån isolaten, enskilda kolonier, kan erhållas från de arter/stammar man vill jämföra. DNA från bakterierna frigörs med en extraktionsrobot, därefter

mångfaldigas vissa kända polymorfa områden i bakteriens arvsmassa med PCR-teknik.

Om man använder oligonukleotider/primers (startsekvenser) för dessa repetitiva element vid PCR kommer ett antal PCR-produkter med olika längd att amplifieras. Flera av startsekvenserna har inosinbaser på vissa positioner som matchar baserna A, T, C eller G i arvsmassan så att en viss sekvensvariation hos mål-DNA:t kan accepteras.

Epidemiologiskt samband

Konsensusprimers som matchar konserverade repetitiva områden utanför kodande DNA (extragenic) används för ERIC och REP som startsekvenser för att amplifiera DNA mellan dessa repetitiva element. För BOX används endast en primer som binder till boxA och amplifierar ett område ut från denna sekvens.

Då dessa PCR-produkter analyseras och separeras på en agarosgel kommer detta att återges som ett specifikt bandmönster eller fingeravtryck (DNA fingerprint) för varje isolat. Detta bandmönster kan sedan användas vid jämförelser mellan olika arter eller stammar vid ett utbrott.

Om två stammar ger identiska bandmönster är ett epidemiologiskt samband sannolikt, om bandmönstren avviker från varandra kan ett epidemiologiskt samband ej styrkas. ■

Referenser:

Olive DM, Bean P. *MINIREVIEW: Principles and applications for DNA-based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology* 1999;37(6):1661—1669.

Versalovic J, Lupski JR. *Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers (Review). Trends in microbiology* 2002;10(10):S15—S21.