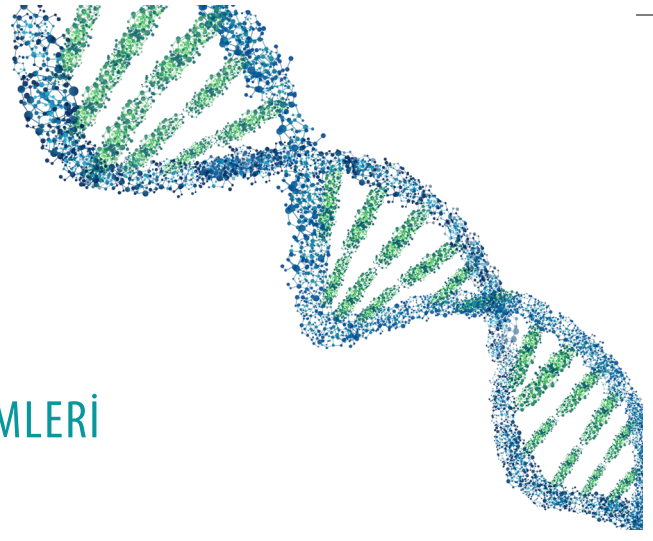


BÖLÜM 23

PLAZMİT TEMELLİ TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ



Alper TEKELİ¹

Plazmitler hayatın her yaşam alanında (bakteriler, arkeler ve ökaryotlar) var olan kromozom dışı deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleridir. Bakterilerde konjugasyon ve transformasyon mekanizmaları ile horizontal gen aktarımının ana araçlarıdır¹⁻³.

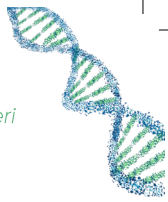
Plazmitler, bakterinin yaşaması için mutlaka gerekli olmayan ve genel olarak buldukları bakteriyel konaklarının ortama uyum sağlamasını kolaylaştıran genler içerirler, bu genlere örnek olarak; toksin-antitoksin, virülans faktörleri, antibiyotik biyosentezi ve metabolik yollarda rol alan genler, metal ve antimikrobiyal direnç genleri verilebilir. Bu aksesuar genler, lateral gen transferi mekanizmalarında rol alan aktarılabılır elemanlar üzerinde bulunabilirler, bu durum plazmit genomlarında görülen mozaik yapılara neden olur. Plazmitlerin dikey ve yatay aktarımı ve plazmit kaynaklı genlerin değişimi karmaşık dinamiklere neden olmakta ve klasik popülasyon genetiği araçlarının kullanımını kısıtlamakta, dolayısıyla plazmitlerin evrensel bir çerçevede sınıflandırılmasını zorlaşmaktadır⁴. Günümüz için çok önemli problemlerden bir tanesi

olan plazmit-araçlı antibiyotik direncinin epidemiyolojisinde, plazmitlerin bir tiplendirme şemasına göre sınıflandırılması önemli katkılar sağlayacaktır⁵. Plazmit tiplerinin bileşimleri, antibiyotik direnç epidemisinin farklı plazmitlerle mi yoksa tek baskın bir plazmitten mi kaynaklandığını gösterebilmek potansiyeline sahiptir^{6,7}.

Plazmit Tiplendirilmesi

İlk plazmit tiplendirilmesi şeması Datta ve Hedges tarafından 1971 yılında geliştirilmiş, konjugasyon deneyleri ile beş uyumsuzluk (Inc) grubu tanımlanmış, ve farklı gruplara ait plazmitler ve buldukları bakteri hücrelerindeki kalıcı birliktelikleri ortaya konulmuştur⁸. Günümüzde sıklıkla kullanılan tiplendirme şemaları Inc/rep tiplendirmesidir ve bu tiplendirmeye göre yapılan sınıflandırma, konjugasyon temelli şema ile çoğunlukla tutarlılık göstermektedir. İlk replikon tiplendirme yöntemi, 19 farklı replikonun kullanıldığı "Southern" hibridizasyon yöntemine dayanmaktadır⁹, takip eden süreç içerisinde polimeraz zincir reaksiyonu [*polymerase chain reaction* (PCR)] "PCR - based replicon typing

¹ Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., atekeli@medicine.ankara.edu.tr



dizileme hata oranı ve cihazların maliyeti sorundur. Kısa okuma ile uzun okuma yapabilen cihazlardan elde edilen verilerin "Unicycler", "hybridSPAdes", "Masurca" gibi örnekleri olan, hibrit "assembler"lar kullanılarak birlikte değerlendirimi ile plazmitlerin moleküler epidemiyolojisi hakkında daha güvenilir veri elde edilebilecektir^{56,57}.

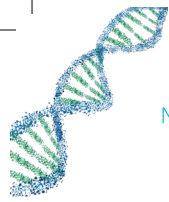
WGS, plazmit tiplendirmesinde ya referans temelli haritalandırma ya da de novo okuma şeklinde kullanılabilir⁵. Referans temelli okumaların haritalandırılması tek nükleotit polimorfizm (SNP)'lerin karakterize edilmesi ve ilgilenilen bölgenin gösterilmesi açısından hızlı ve kesin sonuç verir⁵⁸. Tanımlanmış kor genom SNP'leri izolat filogenetiği oluşturulmasında kullanılabilir ek olarak SRST2 ve benzeri haritalandırma araçların yardımı ile replikonlar ve direnç genlerinin hızlı epidemiyolojik sürveyansı ortaya konulabilir ancak bu yöntem ile yapısal bilgiye ulaşmakta problemler bulunmaktadır; örneğin saptanan direnç geni kromozomda mı yoksa plazmit üzerinde mi, eğer plazmit üzerinde ise hangi plazmit tipi ile ilişkilidir. Bu sorunların aşılması için de novo okuma assembly kullanılır, bu yöntem, SNP ve lokus saptanmasında daha az duyarlı iken referansdan bağımsız yapısal bilgi ve referans verilerde bulunmayan bölgenin tanımlanması için faydalı bilgiler verir³¹.

Antibiyotik direnç gelişiminde plazmitlerin oynadığı rol bilinmektedir, günümüzde sürveyans ve salgın analizleri, klonal izolatların SNP analizi ve cgMLST yöntemleri ile izlenmesine yoğunlaşmış bulunmaktadır, bu salgın araştırmaları için uygun görülmeyle birlikte, plazmit konjugasyon veya hareketliliği nedeni ile ortaya çıkan ve klonal salgından ziyade plazmit aracılı salgınları araştırmada uygun değildir⁵⁹. Hastane ortamında antibiyotik direnç gelişimi ve yayılımının tam olarak anlaşılabilmesi ancak plazmit epidemiyolojisinin ortaya konulması ile mümkün olacaktır.

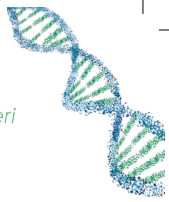
Kaynaklar

1. Shintani M, Suzuki H. in DNA Traffic in the Environment 109-133 (Springer, Singapore, 2019).
2. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, et al. Dissemination of

- antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol* 2016;19(7): 173.
3. Halary S, Leigh JW, Cheaib B, Lopez P, Bapteste E. Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107: 127-132.
4. Acman M, van Dorp L, Santini JM, Balloux F. Large-scale network analysis captures biological features of bacterial plasmids. *Nat Commun* 2020;11(1): 2452.
5. Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, Doumith M, Ellington MJ, Peto T, et al. Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Front Microbiol* 2017;9(8): 182.
6. Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais Á, Galán JC, Alvarado A, et al. Spread of blaCTX-M-14 is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 5204–5212.
7. Pecora ND, Li N, Allard M, Li C, Albano E, Delaney M, et al. Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system. *mBio* 2015;28:6(4): e01030.
8. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi-R factors. *Nature* 1971;234: 222-3.
9. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas VK, et al. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 1988;52: 375-95.
10. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63: 219-28.
11. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella. *J Antimicrob Chemother* 2009;63: 274-81.
12. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010;65: 2518-29.
13. Boot M, Raadsen S, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls C. Rapid plasmid replicon typing by real time PCR melting curve analysis. *BMC Microbiol* 2013;13: 83.
14. Bousquet A, Henquet S, Compain F, Genel N, Arlet G, Décré D. Partition locus-based classification of selected plasmids in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* spp.: an additional tool. *J Microbiol Methods* 2015;110: 85-91.
15. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28: 79-100.
16. Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One* 2012;7: e40438.
17. Compain F, Poisson A, Le Hello S, Branger C, Weill FX, Arlet G, et al. Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in Enterobacteriaceae. *Int J Med Microbiol* 2014;304: 236-42.
18. Kiko H, Niggemann E, Ruger W. Physical mapping of the restriction fragments obtained from bacteriophage T4 dC-DNA with the restriction endonucleases SmaI, KpnI and BglII. *Mol Gen Genet* 1979;172: 303-12.



19. García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2008;61: 1229-33.
20. García-Fernández A, Villa L, Moodley A, Hasman H, Miriagou V, Guardabassi L, et al. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother* 2011;66: 1987-91.
21. Hancock SJ, Phan MD, Peters KM, Forde BM, Chong TM, Yin WF, et al. Identification of IncA/C plasmid replication and maintenance genes and development of a plasmid multi-locus sequence-typing scheme. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;61: e01740.
22. Garcia-Fernandez A, Carattoli A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2010;65: 1155-61.
23. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(5): 1121-1137.
24. Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W. Plasmids, pp: 183–218. In: *Molecular Genetics of Bacteria*. 2013 4th ed. ASM Press, Washington, DC.
25. Taylor D, Gibreel A, Lawley T, Tracz D. Antibiotic resistance plasmids, pp: 473–485. In: B Funnell, G Phillips (eds), *Plasmid Biology*. 2004 ASM Press, Washington, DC.
26. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 4168-4177.
27. Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJS, Løhr M, Hasman H, Aarestrup FM. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol. Methods* 2010;80: 25-43.
28. Lozano C, García-Migura L, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C, Aarestrup FM. Expansion of a plasmid classification system for gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in *Staphylococcus aureus* strains of human, animal, and food origins. *Appl Environ Microbiol* 2012;78: 5948-5955.
29. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7): 3895-903.
30. Center for Genomic Epidemiology (2016). PlasmidFinder / pMLST. Available at: <http://www.genomicepidemiology.org/> [accessed August 5, 2016].
31. Inouye M, Dashnow H, Raven LA, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, et al. SRST2: rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med* 2014;6: 90.
32. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrovski S, McCallum CM, Henikoff S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 1998;26(7): 1628-35.
33. Freitas AR, Novais C, Tedim AP, Francia MV, Baquero F, Peixe L, et al. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS One* 2013;8(3): e60589.
34. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33: 657-687.
35. Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. The repertoire of ice in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* 2011;7(8): e1002222.
36. Dealtry S, Ding GC, Weichelt V, Dunon V, Schlüter A, Martini MC, et al. Cultivation-independent screening revealed hot spots of IncP-1, IncP-7 and IncP-9 plasmid occurrence in different environmental habitats. *PLoS One* 2014;9(2): e89922.
37. Laguerre G, Mazurier S I, Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae in field populations. *FEMS Microbiol Ecol* 1992;10(1): 17-26.
38. Shearer JE, Wireman J, Hostetler J, Forberger H, Borman J, Gill J, et al. Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. *G3 (Bethesda)* 2011;1(7): 581-91.
39. Villa L, Carattoli A. Plasmid Typing and Classification. *Methods Mol Biol* 2020;2075: 309-321.
40. Alvarado A, Garcilla'n-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One* 2012;7: e40438.
41. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance- nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(1): 34-39.
42. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS One* 2015;10(5): e0123063.
43. Fortini D, Fashae K, Villa L, Feudi C, García-Fernández A, Carattoli A. A novel plasmid carrying blaCTX-M-15 identified in commensal *Escherichia coli* from healthy pregnant women from Ibadan, Nigeria. *J Global Antimicrob Res* 2015;1: 9-12.
44. Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67: 1645-1650.
45. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* 2012;68: 43-50.
46. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfersystems and host taxonomy. *Front Microbiol* 2015;31(6): 242.
47. Lanza VF, Tedim AP, Martínez JL, Baquero F, Coque TM. The plasmidome of firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbio. Spectr* 2015;3(2): PLAS-0039-2014.



48. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Mol Biol Rev* 2010;74(3): 434-52.
49. Dib JR, Wagenknecht M, Farías ME, Meinhardt F. Strategies and approaches in plasmidome studies-uncovering plasmid diversity disregarding of linear elements? *Front Microbiol* 2015;26(6): 463.
50. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3): 1369-73.
51. Stoesser N, Sheppard AE, Moore CE, Golubchik T, Parry CM, Nget P, et al. Extensive within-host diversity in fecally carried extended spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* Isolates: Implications for transmission analyses. *J Clin Microbiol* 2015;53(7): 2122-31.
52. Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, et al. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(4): 1008-15.
53. Nagarajan N, Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet* 2013;14(3): 157-67.
54. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, Giess A, Yeh AJ, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: Insights into endemicity from Whole-genomesequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(3): 1656-63.
55. Koren S, Phillippy AM. One chromosome, one contig: complete microbial genomes from long-read sequencing and assembly. *Curr Opin Microbiol* 2015;23: 110-20.
56. David S, Cohen V, Reuter S, Sheppard AE, Giani T, Parkhill J, et al. Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117(40): 25043-25054.
57. Khezri A, Avershina E, Ahmad R. Hybrid Assembly Provides Improved Resolution of Plasmids, Antimicrobial Resistance Genes, and Virulence Factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Microorganisms* 2021;9(12): 2560.
58. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;15;25(14): 1754-60.
59. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems R.J.L., Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene based approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(4): 350-354.