**حسین حضرتی نوین؛ کارشناس علوم آزمایشگاهی و کارشناس ارشد بیوشیمی،**
**مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل**
**هادی نکته سنج؛ کارشناس علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه درمانگاه تامین اجتماعی شعبه مشگین شهر، استان اردبیل**
**حسین شعاعی دیزج؛ کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز آموزشی و درمانی آیت الله طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز**

# جایگاه پلاسمیدها در بررسی های اپیدمیولوژیکی

**پلاسمیدها مولکول های DNA دو رشته ای مستقل خارج کروموزومی هستند که در بیشتر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و نیز در یوکاریوت های پست مثل مخمر یافت می شوند. یک پلاسمید می تواند در یک روش کنترل شده به شیوه ی فیزیکی مستقل از کروموزم میزبان همانندسازی کند. پلاسمیدها با روش های ترانسفورماسیون، ترانسدوکسیون و کونژوگاسیون می توانند انتقال یابند، که به میزبان و شرایط محیطی بستگی دارد. بیشتر پلاسمیدها ساختار دو رشته ای حلقوی با پیوند کووالانت(Covalently Closed Supercoiled= CCC) دارند، اما پلاسمیدهای خطی در چندین جنس باکتریایی نظیر استرپتومایسس، بورلیا، نوکاردیا، رودوکوکوس، آگروباکتریوم، تیوباسیلوس و حتی دراشریشیا و بعضی از مخمرها یافت شده اند. پلاسمیدهای حلقوی همواره در هر دو رشته با پیوند کووالانت پیوسته بوده و بیشتر دارای سوپرکویل منفی هستند. ساختار حلقوی پلاسمیدها را از اثرات تخریبی آنزیم های اگزونوکلئاز محافظت می کند.**

## اهمیت پلاسمیدها

وجود پلاسمیدها برای ماندگاری یاخته ضروری نیست، اما می تواند دامنه گسترده ای از ویژگی های معمول ژنتیکی را کدکنند که میزبان خود را برای رقابت بهتر با سایر میکروارگانیسم های اشغال کننده همان مکان اکولوژیک مستعد سازد. یکی از ویژگی های که پلاسمیدها را در میکروبشناسی با اهمیت خاص جلوه گر می سازد توانایی آنها در حمل ونقل ژن های کد کننده مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی است. این نوع از پلاسمیدهادر باکتری ها گسترش وسیعی دارند و ممکن است بین ارگانیسم های متفاوت منتقل شوند و پلاسمیدهای مقاومت (Resistance plasmids) نامیده می شوند که جایگاه دامنه وسیعی از ژن های کد کننده مقاومت به طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مثل آنتی بیوتیک ها، املاح سنگین، عوامل جهش زا مثل اتیدیم برماید و حتی برخی عوامل ضدعفونی کننده نظر فرمالدئید است.

## اندازه پلاسمیدها

اندازه پلاسمیدها از 1 Kbp تا چند صد Kbp متغیر است. کوچکترین آنها p15A بوده که تنها DNA لازم برای جا دادن ۲ یا ۳ ژن کوچک را دارا است. پلاسمیدهای توان کنش کونژوگاسیون حداقل 30 Kbp اندازه دارند.

## همانندسازی پلاسمیدها

برخی از پلاسمیدها برای شروع همانندسازی نیاز به پروتئین Rep دارند که توسط خود پلاسمید سنتز می شود. این پروتئین به تنهایی یا در ترکیب با پروتئین dnaA کنش می کند. برخی از پلاسمیدها برای همانندسازی به فرآورده های اضافی کد شده توسط میزبان نظیر dam متیلاز، فاکتورهای میزبانی الحاق شونده و پروتئین های شوک حرارتی نیاز دارند. سایر پلاسمیدها نظیر col EI یک مولکول RNA مختص پلاسمید کد می کنند و به DNAپلیمراز RNA، I پلیمراز و ریبونوکلئاز H کد شده توسط سلول میزبان نیاز دارند.

## مدل های همانندسازی پلاسمیدهای حلقوی

### ۱- همانندسازی به روش تتا (Theta replication)

در این مدل، همانندسازی از یک مبدا ثابت در یک جهت یا در هر دو جهت پلاسمید پیش می رودو هر دو رشته به طور همزمان همانندسازی می کنند و هر دو رشته پلاسمید والد در طول پروسه همانندسازی در تماس باهم باقی می مانند.

### ۲- همانندسازی به روش دایره چرخان (Rolling circle replocation)

دراین مدل، پلاسمید یک پروتئین شروع کننده بنام Rep را کد می کند، که فعالیتی شبیه توپوایزومراز و اندونوکلئاز اختصاصی از نظر ترادف دارد. این پروتئین در یکی از دو رشته پلاسمید در منطقه شروع هممانند سازی با ایجاد شکاف یک انتهای ۳َ-OH ایجاد می کند که به هنوان یک انتهای آغازین

عمل می کند. همانندسازی با طویل شدن از جایگاه ۳ʹ-OHبا استفاده از رشته مکمل بعنوان الگو پیش می رود. همانندسازی بیشتر از سمت راست حلقه شروع به گردش می کند و در نتیجه یک مولکولDNA دو رشته ای و یک مولکول DNA تک رشته ای ایجاد می شود. مولکول تک رشته ای حلقوی یک لوپ سنجاق سری ایجاد می کند که این قسمت توسط DNA پلیمراز شناسایی می شود و در یک روش خیلی اختصاصی گونه یک پرایمر ایجاد می کند که ابتدابه وسیله DNA polymerase I و سپس توسط DNA polymeraseIII طویل می شود.

همانندسازی برخی از پلاسمیدها کمتر تحت کنترل است و تعداد نسخه های پلاسمید در داخل سلول در یک زمان خیلی زیاد و تا حتی بیشتر از ۱۰۰ نسخه می باشد. برخی از پلاسمیدهاتحت کنترل شدید همانندسازی بوده و فقط ۱ تا ۳ نسخه از پلاسمید در یک زمان در سلول وجوددارد.

## الگوی پلاسمیدی

الگوی پلاسمیدی بر اساس تعداد و اندازه پلاسمیدهای موجود در یک سویه به عنوان مبنایی برای شناسایی سویه است که در شناسایی سویه های تعداد زیادی از باکتری‌ها مورداستفاده واقع می شود. تجزیه کاملتر DNA پلاسمیدی، به ویژه مولکول‌های بزرگ آن به دنبال هضم با آنزیم‌هایی کارویژه توان پذیر است. سه تیپ از این آنزیم‌های با میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می شوند که تیپ II این نوع آنزیم‌ها توالی اختصاصی در DNA را شناسایی کرده و آن را در محل شناسایی یا نزدیک محل شناسایی برش می دهند. توالی هایی که توسط این آنزیم‌ها شناسایی می شود حدود ٤ تا ٦ جفت باز طول دارند. یکی از ویژگی های این توالی های ٤ تا ٦ جفت بازی این است که بیشتر به گونه‌ی قرینه می باشند، و به نام پالیندرومیک خوانده می شوند. به خاطر اختصاصی بودن محل شناسایی، یک آنزیم محدودالاثر همیشه یک قطعه اختصاصی را به تعداد قطعات معین و با طول مشخص برش می دهد.

اهمیت تعیین الگوی پلاسمیدی در مطالعات اپیدمیولوژیک

به‌طور کلی روش های مورد استفاده در تیپ بندی عوامل میکروبی جهت اهداف عملی زیربکار گرفته می شوند:

۱- بررسی کانون مشترک بیماری

۲- بررسی انتشار عفونت ازیک بیمار به بیمار دیگر

۳- بررسی عفونت تک گیر

٤- تعیین هویت تیپ های بیماریزای عوام میکروبی

٥- افتراق سویه های میکروبی آندمیک از سویه های اپیدمیک

٦- کنترل اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی

اپیدمیولوژی مطالعه توزیع و شاخص‌های بیماری‌های موجود در جمعیت‌های انسانی است. به‌علت اینکه ویژگی ها فنوتیپی باکتری‌ها نظیر الگوهای بیوشیمیایی، باکتریوفاژ تایپینگ، وجود آنتی‌ژن‌های سطحی سلول و الگوهای حساسیت به عوامل ضدمیکروبی براساس تغییرات در فاز رشد و موتاسیون خودبخودی، تمایل به تغییر دارند، بنابراین استفاده از این ویژگی ها برای شناسایی منبع عفونت و شیوع آن برای بررسی عفونت‌های ایجادشده توسط گونه‌های هتروژن باکتری‌ها مفید نخواهد بود.جنبه مولکولی با استفاده از تکنیک‌های بیولوژی برای مشخص کردن محتوای اسیدنوکلئیک یا اسیدامینه اشاره دارد، بنابراین اپیدمیولوژی مولکولی آنالیز اسیدها نوکلئیک و پروتئین‌ها در مطالعه شاخص‌های بیماری و سلامت در جمعیت های انسانی است که در این میان آنالیز الگوی پلاسمیدی ساده ترین و آسان‌ترین روش برای اپیدمیولوژی مولکولی به‌شمار می رود.

## نتایج آنالیزالگوی پلاسمیدی چند باکتری عامل عفونت های بیمارستانی

- **سودوموناس ائروجینوزا(Pseudomonas aeruginosa)**

۱- طبق مطالعه انجام شده در دانشگاه علوم پزشکی تهران توسط دکتر بادامی و همکاران، DNA پلاسمیدی در ٦۲درصد از کل سویه های مورد مطالعه نشان داده شده است. تعداد پلاسمیدها نیز بین ۱ تا ٤ عدد و اکثرا ۳ عدد بوده است.

۲- برپایه ی پژوهش های Millesimo و همکاران در ایتالیا در سال۱۹۹٦، DNA پلاسمیدی در ٤٥/۲ درصد از کل سویه های مورد مطالعه موجود بوده و وزن مولکولی پلاسمیدها از ۱ کیلو جفت باز تا ۲۳ کیلو جفت باز متغیر بوده و نیز تعداد پلاسمیدها بین ۱ تا ۳ عدد بوده است.

۳- در یک بررسی انجام شده در سال ۲۰۰٤ در ترکیه توسط AÇik و همکاران DNA پلاسمیدی در ۷/٥ درصد از کل سویه های مورد مطالعه نشان داده شده و وزن مولکولی پلاسمیدها بین ۱/۲ تا ٤/۲ کیلو جفت باز بوده است و تعداد پلاسمیده از ۱ تا ٤ عدد گزارش شده است.

- **اشریشیا کولی(Escherichia coli)**

۱- در سال ۱۳۹۲ طبق مطالعه انجام شده توسط نورامیر مظفری ثابت و همکاران ۷۸/۳ درصد از سویه های اشریشیا کولی دارای DNA پلاسمیدی بوده اند. تعداد پلاسمید از ۱ تا ۸ عدد متغیر بود و وزن مولکولی آنها در محدوده ۵/۲ کیلو جفت باز تا ۷/۲ کیلو جفت باز متغیر بوده است.

۲- در سال ۱۳۸۲ طبق مطالعه انجام شده توسط دکتر نهایی و همکاران، DNA پلاسمیدی در ۹۰درصد از کل سویه های مورد مطالعه نشان داده شده است. وزن مولکولی پلاسمیدها در محدوده ۱ تا ۲۱ متغیرو تعداد پلاسمیدها بین ۱ تا ۷ عدد گزارش شده است.

۳- در سال ۲۰۰۹ طبق مطالعه انجام شده توسط Babu Uma و همکاران در هندوستان، DNA پلاسمیدی در ٦٤ درصد از کل سویه های مورد مطالعه جدا شده از نمونه های اسهالی نشان داده شده است. وزن مولکولی انها در محدوده ۱ تا ۲۵ بوده است.

- **کلبسیلا پنومونیه(Klebsieela pneumonia)**

۱- بر طبق مطالعه انجام شده توسط Olusola A. Akingbade و همکاران در سال ۲۰۱۳ درنیجریه، DNA پلاسمیدی در ۳۷/۰۳ از کل سویه ها مشاهده شده است.

۲- در مطالعه انجام شده توسط دکتر میرداود عمرانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ارومیه، DNA پلاسمیدی در ۲۵/٦ درصد از کل سویه ها مشاهده شده است.

## معایب و محدودیت های تعیین الگوی پلاسمیدی

۱- بعضی ایزوله ها فاقد پلاسمید بوده و غیر قابل تبپ بندی با این روش می باشند.

۲- به علت اینکه پلاسمیدها براحتی از دست می روند و یا به دست می آیند، بدینروی پروفایل های پلاسمیدی الگوی پایداری ندارند.

۳- ترکیب و محتوای DNA پلاسمیدی، بخاطر جهش زایی ترانسپوزونی، ناپایدار بوده و دستاوردهای مثبت و منفی کاذب وجود دارد.

### منابع:

1. Bennet PM, Hove TGB: Bacterial and bacteriophage genetics in -systematic bacteriology, ninth edition, Amold, bath press,Avon. 251 .266, 1998

2. Actis LAand etal: Bacterial plasmids, replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to .antimicrobial components. Frotiers in Bioscience, 3: 43-62, 1999 :

3. Thomas CM: Plasmids in encyclopedia of microbiology. Ed -Lederberg J, Volume 3, second ed. Aademic press, San Diego, 711 .729, 2000.

4. Nicklin J and etal: Instant notes in microbiology, Bios Scientific .Publishers, Guildfoed, UK, 122-128, 1999.

5.Elwell LP, Shipley PL: Plasmid mediated factors associated with ,virulence of bacteria to animals. Ann Rev Microbiol, 34: 465-469 .1980.

6. Jawetz E and etal: Medical Microbiology, Lange, 22 th edition .Mc Grow Hill, New York, 229-231 &144-175, 2002.

7. Broda P: Plasmids, W.H. Freeman and company limited, San .Francisco, 5-22, 125-136, 1979

8. Poh CL: Yeo CC: Recent advances in typing of .Pseudomonasaeruginosa . J Hosp Infect. 24:175-181, 1993.

9. Woo-Hoo K and etal: Application of ribotyping for molecular epidemiologic study of Escherichia coli isolated from patients with .urinary tract infections. Korean j Infect Disease, 27:505-530, 1997.

10.Lewin B: Genes. Vl. Oxford, New York, 429-470, 505-530, 1997.

11. Griffiths JF and etal: Modern Genetic Anaysis. Fredom, New .York, 327-329, 1999.

12.Millesimo and etal: Pseudomonas aeruginosa clinical isolates serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. Euro J Epidemiol, 12:1123-9, 1996.

13. AÇik L and etal: Antibiotic susceptibility, plasmidprofiles and RAPD PCR analysis of c Pseudomonas aeruginosa linical isolated in Turkey. Available from w3.. gazi. Edu.tr/leyacik/rpd.htm, 2005.

14. Amir Mozaffasri Sabet N and etal: Antibiotic resistance and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from Karaj City Patients. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal:3(12), 2012.

15. Nahaei M.R and etal: Antibiotic resistance and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from urinary tract infections from outpatient and in patient in Imam Khomeini Educational and Treatment Centre.

16.Babu Uma and etal: Antibiotic Sensitivity and Plasmid Profiles of Escherichia coli Isolated from Pediatric Diarrhea. J Glob Infect Dis, 1(2): 107–110: 2009.

17. O Akingbade and etal: Resistant plasmid profile analysis of multidrug resistant Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Abeokuta, Nigeria. African Health Sciences , 14 (4), 2014 .

18. Olusola A. Akingbade and etal: Plasmid Profile of Isolated Klebsiella Species in a Tertiary Hospital in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. World Applied Sciences Journal , 21 (3): 371-378, 2013.

19. mir davood omrani and etal: Plasmid Profiling of Klebsiella Species and its relation with antibiotic resistance at two hospitals of Urmia(Iran). Journal of Applied Sciences, 8(15):2781-2784, 2008.