تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به کمک روش ژنوتیپی

دکتر مسعود حاجیا: دانشگاه علوم پزشکی همدان

دکتر سیدرضا حسینی دوست: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله

چکیده

در سالیان اخیر بسیاری از محققین به دنبال ارایه روشی دیگر جهت تشخیص مقاومت‌های دارویی در باکتری‌ها می‌باشند. این کوشش‌ها، حکایت از نتایج نارضایت بخش روش کنونی دارد. روش متعارف کنونی مبتنی بر تعیین حساسیت ارگانیسم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر می‌باشد. از جمله ضعف‌های احتمالی روش‌های موجود تعیین حساسیت که جلب توجه می‌نماید عبارتند از: ضرورت جداسازی و شناسایی ارگانیسم، استاندارد نمودن میزان ارگانیسم و شرایط نگهداری، رقت مناسب آنتی‌بیوتیک که معرف میزان حساسیت باکتری باشد، و نیز نوع محیط کشت، علاوه بر این کارایی این روش در میکروب‌های کند رشد، سخت رشد و پارازیت‌های اجباری داخل سلولی مطلوب نمی‌باشد.

در حال حاضر محققین تاکید بر ضرورت شناسایی ژن‌های مسؤول مقاومت دارویی و ردیابی ژنتیکی آن‌ها توسط روش‌های ملکولی دارند که مبتنی بر ایده‌ای کاملاً متفاوت نسبت به روش رایج می‌باشد. این روش تنها در صورتی به‌صورت یک راهکار اجرایی درخواهد آمد و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده خواهد

شد که قبل از آن روش‌های ملکولی بتوانند کارایی خود را اثبات نمایند. از طرف دیگر سوالات موجود در خصوص چگونگی ارتباط وجود ژن‌های مقاومت دارویی با مقاومت دارویی در ارگانیسم‌ها، امکان ارایه تستی واحد برای هر ژن در کلیه ارگانیسم‌ها، تعیین هم‌زمان عامل بیماری‌زا و ژن مقاومت دارویی و برخی از سوالات دیگر باید پاسخ داده شود. در این مطالعه سعی گردیده با مروری مختصر در موضوع فوق، امکان موفقیت آن به بحث کشیده شود.

مقدمه

هنگامی که فردی دچار عفونت باکتریایی است، برخورداری از تکنیک‌های تشخیص که دارای سرعت، حساسیت و ویژگی مطلوب باشند حرف اول را در آزمایشگاه می‌زند. در کنار آن معرفی آنتی‌بیوتیک‌های مناسب و مقاومت‌های دارویی احتمالی از وظایف مهم دیگر آزمایشگاه میکروب‌شناسی می‌باشد. متاسفانه در بسیاری از موارد آزمایشگاه موفق به شناسایی عامل بیماری‌زا نمی‌شود، در نتیجه توانایی معرفی مقاومت‌ها و حساسیت آنتی‌بیوتیکی عامل بیماری‌زا را در آن مورد نخواهد داشت. در موارد اندکی که عامل بیماری‌زا شناسایی می‌شود نیز جواب آزمایشگاه و نتیجه آنتی بیوگرام پس از چند روز در دسترس قرار می‌گیرد. این عدم پاسخ به موقع آزمایشگاه نسبت به عامل عفونت و میزان حساسیت‌های دارویی آن باعث می‌گردد که بیماران به‌صورت تجربی درمان گردند.

در مواردی که عفونت‌های حاد مورد نظر می‌باشند بیماران با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف درمان می‌شوند. تحقیقات موجود موید آن است که حتی در درمان عفونت‌های معمولی چنین آنتی‌بیوتیک‌هایی به‌وفور تجویز شده‌اند. مجموعه شرایط فوق سبب به‌وجود آمدن مقاومت دارویی گسترده‌ای شده است. وجود این مقاومت‌ها در عفونت‌های فرصت طلب، و عواملی نظیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ویبریوکلرا هم اکنون به‌صورت یک معضل مهم در آمده است. البته برخی از عوامل باکتریایی مسؤول عفونت‌های بیمارستانی نیز از مدت‌ها پیش به‌عنوان مسؤول مقاومت‌های چندگانه شناخته شده‌اند.

بدیهی است در مدیریت درمان جامعه معقول نمودن میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌واسطه اهمیت از منبع اقتصادی و هم‌چنین در پیشگیری از پیدایش مقاومت‌ها همواره می‌باید از توجه جدی برخوردار باشد. بدیهی است جهت دست‌یابی به این مهم پیوسته باید افزایش دانش پایه نسبت به شناسایی مکانیسم‌های ایجاد مقاومت هدف اصلی بوده و به‌عنوان اصلی‌ترین استراتژی در پیشگیری و غلبه بر مقاومت‌ها در نظر گرفته شود. در کنار آن توسعه تست‌های تشخیص که واجد سرعت بالا و حساسیت مناسب باشد نیز مورد حمایت قرار گیرند.

روش متعارف تعیین حساسیت کنونی

روش تعیین حساسیت در قدم اول متکی است بر جداسازی و شناسایی عامل بیماری‌زا و در مرحله بعدی بر اساس میزان ممانعت از رشد باکتری در محیط کشت توسط آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت، که بر این اساس حساسیت و مقاومت‌های احتمالی ارگانیسم سنجیده

می‌شود. نتایج آزمایشگاهی رضایت‌بخش به شرایط انجام آزمایش بستگی داشته و در عمل مشاهده می‌شود که انواع متفاوت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از خود حساسیت‌های گوناگونی نشان می‌دهند. لذا برای به‌دست آوردن جواب قابل اعتماد کلیه عوامل تاثیرگذار نظیر تراکم باکتری مورد استفاده، نوع محیط کشت، غلظت آنتی‌بیوتیک، زمان آنکوباسیون و بسیاری از شرایط دیگر باید در نظر گرفته شود. تمامی این عوامل می‌تواند به گونه‌ای در تفسیر نهایی آزمایش تاثیر نمایند.

شناسایی مکانیسم‌های ژنتیکی مقاومت دارویی

تکنیک‌های ملکولی در دو دهه گذشته دچار تحولات مهمی گردیده‌اند. با طرح شیوه‌های متعدد هر یک از محققین سعی بر آن داشتند تا به گونه ای نارسایی این رشته را در شناسایی میکروارگانیسم‌ها با طرح روش‌های گوناگون به‌ویژه روش‌های کاربردی برطرف نمایند. در این میان آزمایش‌های مبتنی بر تعیین اسید نوکلئیک در مقایسه با سایر روش‌ها موفق‌تر بوده‌اند. امروزه روش‌های مبتنی بر تعیین اسید نوکلئیک به‌عنوان یک استاندارد طلایی جایگزینی مناسب برای کشت معرفی می‌گردد. در این راستا با توجه به این که وظیفه مهم دیگر آزمایشگاه میکروب‌شناسی کمک به امر درمان با معرفی آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم و حساس می‌باشد، محققین تلاش نموده‌اند که از این ابزار تشخیصی کارآمد در جهت تعیین مقاومت دارویی نیز بهره جویند. از زمینه‌های موثر در پیدایش این گرایش، مشاهده تغییراتی بود که در برخی از سویه‌ها در زمینه میزان توانایی بیماری‌زایی باکتری‌ها و مقاومت دارویی دیده شد. هم اکنون اثبات شده است که قطعات ژنتیکی متفاوتی مسؤول این تغییرات بوده و توسط مکانیسم‌های گوناگون از سلولی به سلول دیگر منتقل می‌شوند. با توجه به وجود مشکلات متعدد در جهت تعیین حساسیت‌های احتمالی محققین جهت یافتن شیوه‌ای مطمئن‌تر اقدام به به‌کارگیری روش‌های ملکولی برای این منظور نموده‌اند. روش‌ها ملکولی که توانسته‌اند یک دگرگونی واقعی را در این ارتباط پدید آورند بر نظریه‌ای کاملاً متفاوت متکی هستند و آن انجام آزمایش تعیین مقاومت به جای آزمایش تعیین حساسیت می‌باشد، هر چند مطالعات بالینی متعددی برای معتبر ساختن دستاوردهای چنین آزمایش‌هایی مورد نیاز است. هم‌چنین می‌باید برای بسیاری از سوالات پاسخ مناسبی نیز ارایه نمود به‌عنوان مثال: آیا وجود ژن مقاومت همواره می‌تواند نمایانگر وجود مقاومت در باکتری باشد؟ اگر ژن مقاومت کشف نشده باشد آیا به معنی حساس بودن باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر می‌باشد؟ علاوه بر این باید توجه داشت که مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک ممکن است در اثر وجود مکانیسم‌های متفاوتی باشد که به معنی ضرورت انجام بررسی نسبت به تمامی این ژن‌ها می‌باشد.

ژن‌های مقاومت دارویی

شناسایی ژن‌های مقاومت دارویی به‌نظر می‌رسد در ابتدای کار بوده و احتیاج به مطالعات گسترده‌تری داشته باشد تا بتواند به‌صورت یک پروتکل کاری قابل پذیرش درآید. در این صورت دارای نقش کاربردی در آزمایشگاه تشخیص طبی

خواهد بود. مطالعات اولیه انجام شده در ابتدا در جهت شناسایی ژن‌های خاص در باکتری‌های مشخصی صورت گرفت. به تدریج با شناسایی مجموعه ژن‌های مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، محققین در جهت ارایه یک روش کلی اقدام نمودند. هم اکنون تعدادی از مجموعه ژن‌های مسؤول مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های به خصوصی که در باکتری‌ها ممکن است مشاهده شوند شناسایی شده‌اند که ذیلاً برخی از این ژن‌ها بررسی می‌گردد.

متی‌سیلین

مقاومت بر علیه متی‌سیلین در استافیلوکوکوس ائوروس و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی ناشی از سنتز پروتئین متصل به پنی‌سیلین است که توسط ژن mecA تولید می‌شود. هم اکنون به‌کارگیری روش PCR[1] برای شناسایی mecA به‌عنوان یک استاندارد طلایی برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین تایید شده است. این نتیجه بر اساس مطالعات فراوانی است که وجود ارتباط بین ژن mecA و مقاومت به متی‌سیلین را به خوبی نشان داده است. استفاده موفقیت‌آمیز PCR دو گانه جهت شناسایی هم‌زمان S.aureus و ژن mecA نیز مکرراً گزارش می‌گردد.

وانکومایسین

پیدایش مقاومت گسترده به آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله وانکومایسین در آنتروککسی نیز به‌نظر می‌رسد که یکی از مشکلات درمانی حاضر باشد. اهمیت این معضل تا آنجا می‌باشد که توصیه مرکز کنترل بیماری‌ها در مورد این بیماران مبنی بر نگهداری آنان به‌صورت ایزوله می‌باشد. مطالعه بر روی آنتروککسی‌های مقاوم به وانکومایسین سبب شناسایی ژن‌های vanB، vanA و vanC گردیده است. ژن vanC قابل انتقال نمی‌باشد در حالی که ژن‌های vanB و vanA می‌توانند انتقال یابند. در یک مطالعه توانایی تکنیک PCR در تعیین ژن‌های مقاومت به وانکومایسین در آنتروککسی‌ها مطالعه شده و نتایج آن با روش فنوتیپی مقایسه گردیده است. تمامی سویه‌هایی که در روش فنوتیپی از خود نسبت به غلظت ۴ ug/ml از آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان داده بودند در بررسی ژنتیکی نسبت به vanB و vanA دارای نتایج مثبت بودند. روش PCR برای تعیین مقاومت در سویه‌های MRSA[2] نیز به‌کار گرفته شده است. اخیراً سه ژن دیگر از این مجموعه شناسایی شده است vanD، vanC3 و vanC2، که امکان بررسی این مقاومت را در بسیاری از ارگانیسم‌ها فراهم می‌نماید.

تتراسیکلین

مجموعه ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین که در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت یافت می‌شود، مشخص شده است. این مجموعه شامل ۱۴ ژن می‌باشد که بر اساس وجود شباهت‌ها بین این ژن‌ها در چهار گروه دسته‌بندی شده‌اند و پرایمرهای اختصاصی هر گروه مشخص گردیده است گروه یک: شامل tetD، tetC و tetB، گروه دو: tetG، tetE و tetA گروه سه: tetS، tetO، tetM، tetL و tetK، گروه چهار tetX، tetQ و tetP برای مجموعه فوق تست PCR چندگانه طراحی گردید. گزارش شده است که تست مذکور می‌تواند برای هر ارگانیسمی به‌کار برده شود. لذا در شرایطی که در نمونه میکروبی احتمال دخالت عوامل متعدد وجود دارد، به‌نظر می‌رسد به‌کارگیری مجموعه‌ای از پرایمرها برای

شناسایی تک تک میکروارگانیسم‌ها با مشکلاتی مواجه باشد. بر این اساس عده‌ای از محققین پیشنهاد نموده‌اند که تایید صرف وجود عفونت میکروبی در ابتدا با استفاده از پرایمرهای عمومی برای تعیین مقاومت دارویی در عوامل پاتوژن کافی می‌تواند باشد. بیش از ۸۰ درصد از نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه تهیه شده از مایعات بدنی واجد ارگانیسم نمی‌باشند. این پرایمرها قادر به شناسایی ردیف‌های مشابه ژنوم در ارگانیسم‌ها بوده و در صورت مثبت شدن تست تنها وجود عفونت تایید می‌گردد. لذا پس از تشخیص ابتدایی می‌توان اقدام به تعیین نوع مقاومت دارویی نمود. به‌کارگیری پرایمرهای عمومی در این تکنیک سبب ایجاد محصولاتی می‌گردد که دارای ویژگی مخصوصی نبوده و امکان شناسایی اختصاصی را برای محقق فراهم نمی‌نماید. در صورت نیاز به تعیین اختصاصی عامل بیماری‌زا می‌باید با انجام تست دوم که می‌تواند استفاده از PCR، پروب اختصاصی، آنزیم‌های مناسب و دیگر روش‌ها باشد عامل مورد نظر را به‌طور اختصاصی تعیین نمود. باید توجه داشت که شناسایی سریع باکتری‌ها برای کادر درمانی بسیار مفید است اما آنچه مهم‌تر می‌باشد تعیین مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی عامل بیماری‌زا است.

ارایه راه‌کارهای اجرایی برای ردیابی مجموعه ژن‌های مقاومت دارویی

در حال حاضر برخی از سویه‌ها به‌صورت یک مشکل جدی در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشند. شناسایی مجموعه مقاومت‌های احتمالی در این ارگانیسم‌ها با توجه به تاثیر آن‌ها در امر درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این نگاه جدید مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و سودوموناس آئروژنوزا مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ارگانیسم‌ها به مجموعه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند و به‌نظر می‌رسد یافتن آنتی‌بیوتیک مناسب از مشکلات مهم بر سر راه درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها باشد. در یک بررسی مجموعه ژن‌های مقاومت دارویی در توبرکلوزیس شناسایی شده و امکان ردیابی آن که بالغ بر ۱۱ مورد می‌گردد مطرح گردید. شناسایی این مجموعه از ژن‌ها امکان تعیین سریع‌تر مقاومت‌های دارویی را در این باکتری فراهم می‌نماید.

مزیت‌های روش‌های ژنوتیپی تعیین مقاومت دارویی

روش‌های متکی بر DNA و کشف فرآورده‌های اختصاصی تا اندازه‌ای توسعه یافته و تکمیل شده است به‌طوری که اکنون شناسایی میکروارگانیسم‌ها در نمونه در عرض ۲ - ۱ ساعت امکان‌پذیر می‌باشد. علاوه بر این حساسیت بالای این آزمایش‌ها اجازه می‌دهد که یک کپی کروموزوم از ارگانیسم نیز مورد شناسایی قرار گیرد. در حال حاضر کوشش‌های وسیعی در این راستا در جریان است. استفاده از روش‌های ملکولی و مزیت‌های بی‌شمار آن، سبب تشویق محققین گردید تا بیشتر به آن توجه نمایند:

سرعت

در روش رایج کنونی یعنی آزمایش تعیین حساسیت که به جداسازی باکتری‌ها نیاز دارد،

در صورت به‌کارگیری آن برای باکتری‌های سریع‌الرشد نتیجه تا سه روز پس از دریافت نمونه در دسترس قرار نخواهد گرفت. در ارتباط با برخی از باکتری‌های کند رشد نظیر مایکوباکتریوم‌ها و مایکوپلاسماها این زمان بسیار طولانی‌تر خواهد بود. هم‌چنین برخی از باکتری‌ها نظیر کلامیدیاها و ریکتزیاها که پارازیت اجباری داخل سلولی می‌باشند نیز انجام آزمایش با مشکلات متعدد مخصوص به خود همراه می‌باشد. به گونه‌ای که به‌کارگیری این روش را در آزمایشگاه مشکل می‌سازد.

دقت

در روش تعیین حساسیت با توجه به آن که اخذ نتیجه مطلوب به رعایت شرایط متعددی بستگی دارد عملاً از دقت آزمایش کاسته خواهد شد در حالی که روش تعیین مقاومت با توجه به ویژگی و حساسیت مطلوب آزمایش و عدم دخالت عوامل متعدد در کارایی آن، می‌توان انتظار داشت آزمایش از دقت بالاتری برخوردار باشد.

آیا می‌توان برای تعیین مقاومت دارویی در باکتری‌های با مقاومت چندگانه شاخصی تعیین نمود؟

در یک بررسی که توسط Zambardi و همکاران برای تشخیص مقاومت نسبت به اگزاسیلین در S. aureus انجام گرفته است گزارش شده ۹۷ درصد سویه‌های mecA مثبت نسبت به این آنتی‌بیوتیک نیز دارای مقاومت بوده‌اند. لذا این احتمال وجود دارد که ژن مقاومت نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک در یک اپرون قرار داشته باشد که طبیعتاً به بررسی بیشتری احتیاج خواهد داشت.

در مطالعه‌ای دیگر Zambardi و همکاران گزارش نموده‌اند که سویه‌های S. aureus که از خود نسبت به متی‌سیلین مقاومت نشان داده‌اند به مجموعه‌ای از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (جنتامایسین، تتراسیکلین، اریترومایسین، لینکومایسین و پروفلوکساسیلین) نیز مقاوم بوده‌اند. حال این پرسش مطرح می‌باشد که آیا می‌توان از آن به‌عنوان یک شاخص در مواردی که با مقاومت‌های چندگانه مواجه هستیم استفاده نمود یا خیر؟ بدیهی است بررسی این احتمال احتیاج به مطالعات ژنتیکی گسترده‌تری داشته تا ارتباط ژنتیکی ژن‌های مسؤول مقاومت دارویی به خوبی مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به زمینه‌های مطرح شده به‌نظر می‌رسد که در چند سال آینده شاهد تحولات متعددی در زمینه به‌کارگیری این روش تشخیص در تعیین مقاومت دارویی باشیم. تحولاتی که مسلماً در جهت عملی‌تر ساختن نحوه اجرای آن خواهد بود مانند به‌کارگیری روش ژنوتیپی تعیین مقاومت خواه با استفاده از پرایمرهای عمومی و یا پرایمرهای اختصاصی در قالب یک PCR. مزیت‌های استفاده از چنین آزمایش‌هایی متعدد است که اهم آن می‌تواند به شرح زیر باشد:

۱ ـ توسعه روش‌های تشخیصی سریع سبب کاهش مقاوم میزان مقاومت دارویی می‌گردد.

۲ ـ به‌کارگیری این روش و مشخص نمودن مقاومت‌های موجود در ارگانیسم منجر به کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های پرهزینه و وسیع‌الطیف می‌گردد.

۳ـ استفاده از این روش سبب افزایش آمادگی در تشخیص سریع مقاومت‌های دارویی در هنگام بروز اپیدمی‌ها و انتشارهای ناگهانی عوامل میکروبی می‌شود.

۴ـ به‌کارگیری این تست‌ها برای بیمارانی که باید به‌صورت ایزوله نگاهداری شوند بسیار مفید خواهد بود. در صورت شناسایی عوامل میکروبی با مقاومت‌های چندگانه این امکان را فراهم می‌نماید که با ایزوله بیماران از انتشار چنین ارگانیسم‌هایی در سطح جامعه جلوگیری نمود.

۵ـ نکته دیگری که می‌باید توجه داشت، کاهش هزینه‌های مراقبت و سلامت فردی است و انتظار می‌رود با همکاری در کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی افراد زیادی از چنگال مرگ رهایی یابند.

■ **کلید واژه:** مقاومت دارویی، روش تعیین حساسیت

زیرنویس‌ها

1. Polymerase Chain Reaction
2. Meticilline Resistant Staphylococcus Aureus

منابع

1. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of Vancomycin resistant Entrococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J. Clin. Mic. 1999; 37(6): 2090-2092.
2. Loiezz-Durocher, Vachee A Alemaitre N. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: diagnostic methoods. Ann. Biol. Clin. 2000; 58(3): 291-297.
3. Zambardi G, Reverdy ME, Bland S, Bes M Freney J, Fleurette J. Laboratory diagnosis of Oxacillin resistance in Staphylococcus aureus by multiplex-polymerase chain reaction assay. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1994; 19(1): 25-31.
4. Wenzel RP, Edmond MB. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus: Infection control consideration. Clin. Infect. Dis. 1998; 27: 245-251.
5. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. Clin. Infect. Dis. 2001; 33(S): s109-ss113.

تذکر: علاقمندان می‌توانند جهت اطلاع از سایر منابع این مطلب به دفتر مجله رازی مراجعه نمایند.