مقاومت‌های دارویی در مایکوباکتریوم‌ها و ژن‌های مرتبط با آن

یوسف تاروردی‌زاده[1]، رضا کاظمی درسنکی[1]، نفیسه قربانی[2]

[1]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

[2]عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

چکیده:

بیماری سل یکی از مهم‌ترین عوامل اصلی مرگ و میر در دنیای امروز است. امروزه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو ***(DR-TB)*** و یا مقاوم به چندین دارو ***(MDR-TB)*** به علت ناکافی بودن برنامه‌های کنترل سل و استفاده نامنظم از داروهای ضد سلی در حال افزایش است، لذا تشخیص سریع مقاومت دارویی برای جلوگیری از انتشار باکتری‌های مقاوم به دارو یک راهکار مهم در کنترل بیماری می‌باشد. مقاومت چند دارویی که به صورت مقاومت همزمان به حداقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین تعریف می‌شود در بسیاری از کشورها به بیش از ده درصد می‌رسد و به نظر می‌رسد امروزه خیلی بیشتر از آنچه در گذشته نشان داده شده بود گسترش پیدا کرده است. مکانیسم‌های مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم‌ها اساس و پایه کروموزومی دارد و اغلب ناشی از جهش‌هایی است که در ژنوم باکتری رخ می‌دهد. این مقاومت می‌تواند به نسل‌های بعدی باکتری منتقل شود و درمان را دچار اختلال کند. هدف این مقاله مروری بر مکانیسم مقاومت در برابر داروهای ضد سلی و ژن‌های مرتبط با این نوع مقاومت‌ها از دیدگاه مولکولی است.

کلمات کلیدی: داروهای ضد سلی، مقاومت، سل، ژن، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

پیشگفتار:

سالیانه سل موجب مرگ حدود 2 میلیون نفر در دنیا می‌شود و اکثر این موارد در کشورهای در حال توسعه یا عقب مانده اتفاق می افتد. سازمان جهانی بهداشت تخمین زده است که بین سال‌های 2000 و 2020 نزدیک به یک بیلیون فرد دیگر به سل آلوده خواهند شد و از این میان 200 میلیون نفر به بیماری مبتلا شده و 35 میلیون نفر نیز بر اثر بیماری سل جان خود را از دست خواهند داد. علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در درمان و مهار بیماری سل حاصل شده، هنوز هم این بیماری به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی مخصوصاً در کشورهای در حال توسعه باقی است. امروزه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو ***(DR-TB)*** و یا مقاوم به چندین دارو ***(MDR-TB)*** به علت ناکافی بودن برنامه‌های کنترل سل و استفاده نامنظم از داروهای ضد سلی در حال افزایش است. ایران یکی از کشورهایی است که میزان ابتلا به سل در آن بالاست. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ایران یکی از مناطق اندمیک انواع جدا شده‌های مقاوم به دارو نیز هست.

فهرست کلی ژن‌هایی که موتاسیون در آنها باعث مقاومت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس خواهند شد شامل موارد زیر است:

1) سیکوسرین: ***alrA***

2) فلوروکینولون: ***par + gyrA***

3) ماکرولیدها: ***RNA*** ریبوزومی ***23s***

4) ریفامپین: ***rpoB***

5) استرپتومایسین: ***RNA (rrs)*** ریبوزومی ***16s*** + ***s_{12} (rpsl)***

6) اتامبوتول: ***embR ,embA ,embB***

7) ایزونیازید: ***KatG ,furA ,inhA*** *,KasA ,Rvo340 ,iniB ,iniA*

iniC, efpA,ndh, OxyR, ahPC intergenic ***regioh mab – inhA promoter.***

از این بین ما به بررسی ژن‌های ***rpoB***؛ مارکر مقاومت به ریفامپین، ***embB***؛ مارکر مقاومت به اتامبوتول و ***KatG***؛ مارکر مقاومت به ایزونیازید که در بین مسلولین ایرانی شایع‌ترند، خواهیم پرداخت.

ریفامپین:

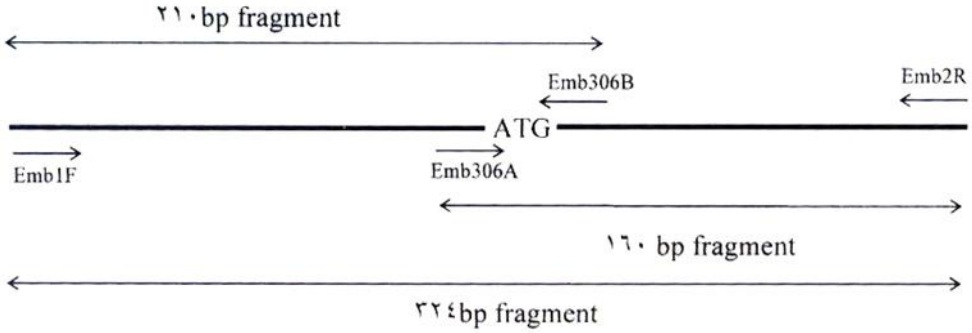
مقاومت چند دارویی که به صورت مقاومت همزمان به حداقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین تعریف می‌شود، در بسیاری از کشورها به بیش از ده درصد رسیده و به نظر می‌رسد امروزه خیلی بیشتر از آنچه در گذشته نشان داده شده بود گسترش پیدا کرده است. ریفامپین به عنوان داروی ضد سل در سال 1972 معرفی شد و از آن موقع به عنوان یک جزء کلیدی در درمان چند دارویی ضد سل مطرح است. ریفامپین یک داروی باکتریسیدال است و به ساب یونیت β آنزیم ***RNA*** پلیمراز وابسته به ***DNA*** متصل می‌شود و مانع شروع رونویسی می‌گردد. استفاده گسترده از ریفامپین و سایر مشتقات ریفامایسین موجب ظهور مقاومت به ریفامپین گردیده است. در مطالعات متعدد نشان داده شده است که موتاسیون در ژن ***rpoB*** که کد کننده ساب یونیت β آنزیم ***RAN*** پلیمراز است، بطور مشخص در ارتباط با فنوتایپ‌های مرتبط با ریفامپین می‌باشد. بیش از 70 نوع موتاسیون متفاوت در ژن ***rpoB*** برای نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین از سراسر جهان گزارش شده است. موتاسیون‌ها در ژن ***rpoB*** بیشتر در یک ناحیه ***81 bp*** به نام ناحیه تعیین کننده مقاومت به ریفامپین ***(RIF resstance determining region)*** یا ***RRDR*** صورت می‌گیرد. از آنجایی که که تا 90 درصد نمونه‌های مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون در کدون‌های 531 و 526 و 516 ناحیه ***RRDR*** هستند، این ناحیه برای تشخیص سریع نمونه‌های مقاوم به ریفامپین استفاده می‌شود، اگر چه نشان داده شده است که آنالیز مولکولی ژن ***rpoB*** در بیش از 90 درصد نژادهای مقاوم به به ریفامپین از نواحی جغرافیایی مختلف برای تشخیص مقاومت به ریفامپین مفید بوده است، اما اطلاعات کمی از ناحیه آسیای خاور میانه در دست است.

اتامبوتول:

از داروهای خط اول در درمان بیماری سل اتامبوتول می‌باشد که در ترکیب با دیگر داروها به کار می‌رود. اتامبوتول با آنزیم‌های آرابینوزیل ترانسفرازهای دیواره سلولی مایکوباکتری‌ها واکنش داده و از سنتز آرابینوگالاکتان که برای ساختن دیواره سلولی لازم است جلوگیری می‌کند و منجر به تجمع اسید مایکولیک می‌گردد که موجب مرگ سلول می‌شود.

اپران ***embcAB***، مایکوباکتری‌های آرابینوزیل ترانسفرازها را کد می‌کند. موتاسیون در ***embB*** می‌تواند منجر بـــــه ایجاد مقاومت به اتامبوتول در مایکوباکتریوم توبوکلوزیس گردد. 90 درصد از موتاسیون در کدون ***ATG-met*** 306 رخ می‌دهد. موتاسیون منجر به جایگزینی اسید آمینه دیگر به جای متیونین می‌شود. اتامبوتول از داروهای با ارزش در درمان بیماری سل می‌باشد، ولی امکان ایجاد مقاومت به اتامبوتول وجود دارد.

از طرف دیگر مایکوباکتر مکانیسم‌های مختلفی را برای فرار از کشته شدن توسط دارو به کار مـی‌گیـرد. یکـی از این مکانیسم‌ها ایجاد موتاسیون در ژن‌هایی است که پروتئین هدف دارو را کد می‌کنند. ژن ***embB*** ژنـی اسـت که آرابینوزیل ترانسفراز را کد می‌کند که پروتئین هدف اتامبوتول می‌باشد. ایجاد موتاسیون در ***embB*** موجـب مقاومت به اتامبوتول می‌گردد. در بیشتر موتاسیون‌ها در ژن ***embB***306 رخ می‌دهد. تعداد سـویه‌هـای مقـاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به یک یا چند داروی خط اول در حال افزایش است و روش استانداردی برای درمـان توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو***(MDR-TB)*** وجود ندارد و عفونت با این سویه‌ها خصوصاً در افرادی که دچـار سوء تغذیه و یا آلوده به ***HIV*** هستند، منجر به مرگ می‌گردد، لذا شیوع ***MDR-TB*** یک خطـر جـدی بـرای کنترل سل در سرتاسر جهان می‌باشد و موجب افزایش سل در دنیا می‌گـردد. روش مولکـولی ***(MAS-PCR)*** برای تعیین مقاومت به داروی اتامبوتول و مقایسه آن با روش ***proportion*** استفاده می‌گردد که موتاسیون در باز اول و سوم ***emb B 306*** را مورد بررسی قرار می‌دهد (شکل شماره 1) تا از این طریق بتوان مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به اتامبوتول را سریع‌تر شناسایی نمود و انتقال سویه‌های مقاوم را به حداقل ممکن رسانید.



شکل شماره 1: نمایی از تکثیر قطعه از ژن *emb B* در روش *MAS-PCR*

مزایای روش *MAS-PCR* برای تشخیص مقاومت به اتامبوتول:

1. آزمایش سریعی است و مستقیماً بر روی نمونه‌های کلینیکی بدون جداسازی ارگانیسم قابل انجام است.
2. این روش ژنوتیپ سویه‌ها را مورد بررسی قرار می‌دهد، در حالی که روش ***proportion*** فنوتیپ یا بیان ژنوتیپ را مورد ارزیابی قرار می‌دهد که تحت تأثیر شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.
3. خطر ***MAS-PCR*** در مقایسه با ***proportion*** کمتر است.
4. با روش ***MAS-PCR*** همچنین شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز صورت می‌گیرد.

معایب روش *MAS-PCR* برای تشخیص مقاومت به اتامبوتول:

1. مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به اتامبوتول ممکن است از طریق مکانیسم‌های دیگر رخ داده باشد.
2. موتاسیون در ***embB306*** در برخی از سویه‌های حساس به اتامبوتول وجود دارد.
3. ممکن است موتاسیون در ***embB306*** وجود داشته باشد ولی موجب مقاومت به اتامبوتول نشود.
4. نتایج مثبت کاذب به سبب آلودگی نمونه‌ها با اسید نوکلئیک خارجی رخ دهد.

ایزونیازید:

علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در درمان و مهار بیماری سل حاصل شده، هنوز هم این بیماری به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی مخصوصاً در کشورهای در حال توسعه باقی است. در حال حاضر ایزونیازید و ریفامپین در کنار هم شالوده‌ی درمان شیمیایی کوتاه مدت عفونت‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را تشکیل می‌دهند. مشاهدات حاکی از آن است که باسیل‌های سل در مجاورت با ایزونیازید خاصیت مقاومت به رنگبری با اسید را از دست داده و از بین می‌روند. بدین ترتیب محققین حدس می‌زنند که این دارو باعث تغییر در ترکیب لیپیدی دیواره سلولی شود. تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و نیز تعیین الگوی حساسیت دارویی آن ارزش فراوانی در بکارگیری روش‌های درمان مؤثر و نیز کنترل جهانی سل دارد. ظهور سویه‌های مقاوم دارویی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مانع بزرگی را در مسیر درمان و کنترل بیماری ایجاد نموده است. رویداد سل مقاوم به دارو در نقاط مختلف جغرافیایی یکسان نیست. فراوانی سویه‌های ***MDR*** (سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با مقاومت توأم به ایزونیازید و ریفامپین) سالهاست که در حال افزایش است و تاکنون چندین مورد از شیوع آنها گزارش شده است. استونی، ایران، چین، هند و برخی نواحی روسیه بعنوان اندمیک‌ترین نواحی وجود مقاومت دارویی معروف شده است. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که نزدیک 5 درصد از باسیل‌های سل کشت داده شده از بیماران ایرانی، ***MDR*** هستند. مقاومت دارویی در یک جمعیت باکتریایی بزرگ باسیل سل در پی موتاسیون‌های خودبخودی تک مرحله‌ای و اتفاقی روی می‌دهد. احتمال بروز موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت دارویی برای ریفامپین 10^{-8} است، در حالی که این مقدار در خصوص ایزونیازید و برخی از داروهای مرسوم ضد سلی 10^{-6} است. بررسی خصوصیات مولکولی سویه‌های باسیل سل مقاوم به داروی متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف، اطلاعات مفیدی برای ارائه روش‌های مولکولی بهتر تشخیص مقاومت دارویی را فراهم می‌آورد. آنزیم

katG باسیل سل هم به عنوان یک آنزیم کاتالاز باعث حذف پراکسید هیدروژن شده و هم به عنوان یک آنـزیم پراکساید می‌تواند ایزونیازید را اکسید کرده و به فرم فعال درآورد تا بتواند اثر ضد سـلی داشـته باشـد. مقاومـت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به ایزونیازید ممکـن اسـت بـه واسـطه انـواع مختلفـی از موتاسـیون‌هـا روی دهـد. موتاسیون‌هایی که در ***katG*** اتفاق می‌افتد مخصوصاً جانشینی ***S315T***، مسئول بروز اکثـر مـوارد مقاومـت بـه ایزونیازید محسوب می‌شود، گرچه فراوانی جانشینی ***katG S315T*** در جمعیت‌های مختلـف یکسـان نیسـت. برخی از این موتاسیون‌ها باعث بروز تغییرات کونفورماسیونی در ***katG*** می‌شوند و برخی نیز از اتصال ایزونیازید جلوگیری می‌کنند. به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد تغییر ***S315T*** که در محل اتصال ایزونیازید بر روی ***katG*** روی می‌دهد عامل بخش عمده‌ای از شکست‌های درمانی سل باشد.

نتیجه گیری:

در حال حاضر تست‌های تعیین حساسیت دارویی به عنوان ابزاری مناسب برای انتخاب رژیم‌های درمانی مناسب جهت درمان موفق مسلولین مخصوصاً سل مقاوم چند دارویی به کار می‌رود. از سویی نیـز انجـام ایـن تسـت‌هـا ارزیابی میزان تأثیر برنامه‌های کنترل سل به خصوص در انواع سل مقاوم به دارو را ممکن مـی‌سـازد. روش‌هـای مختلفی برای تعیین حساسیت باسیل سل به داروهای ضد سلی وجود دارد ولی هیچ یک از آنها کامل نیسـت و نتایج آنها پزشکان را برای درمان مؤثر مسلولین چندان راضی نمی‌کند. جهت انجام روش‌های متداول کلینیکـی مثل روش نسبی و روش مطلق، نیاز به پرسنل کارآمد و ماهر و صرف زمان طولانی و هزینه‌ی بالا می‌باشـد و در عین حال نتایج این تست‌ها چندان قابل تکرار و مطمئن نیست. ایران یکی از کشورهایی است که میزان ابتلا بـه سل در آن بالاست. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ایران یکی از مناطق آندمیک انواع جدا شده‌هـای مقـاوم بـه دارو نیز هست، بنابراین به کار بردن روش‌های مولکولی برای تشخیص موتاسیون‌هـایی کـه مـرتبط بـا مقاومـت دارویی است و می‌تواند زمان مورد نیاز برای شناسایی انواع مقاوم را تا حدود زیادی کـاهش دهـد، بسـیار مفیـد است.

References:

1.Johnson, R., E. M. Streicher, G. E. Louw, R. M. Warren, P. D. van Helden, and T. C. Victor. 2006. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Curr.Issues Mol.Biol. 8:97-111.

2. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis 2002; 185: 1197–202.

3. Yves L. Janin. Antituberculosis drugs: Ten years of research. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2007.

4. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, *et al*. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med* 2001; *344 :* 1294-303.

5. Mark T. McCammon, John S. Gillette, Derek P. Thomas, Srinivas V. Ramaswamy, Edward A. Graviss, Barry N. Kreiswirth, Jan Vijg and Teresa N. Quitugua Detection of *rpoB* Mutations Associated with Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2005; 49(6): 2200-2209.

6. Tang X, Morris SL, Langone JJ, Bockstahler LE. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in Mycobacterium tuberculosis genes associated with drug resistance. J Microbiol Methods. 2005 ;63(3):318-30.

7. Cheruvu Mani, N. Selvakumar,* Sujatha Narayanan, and P. R. Narayanan . Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from India. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(8); 2987-2990 .

8. A Telenti, N Honore, C Bernasconi, J March, A Ortega, B Heym, HE Takiff and ST Cole. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level.j ournal of Clinical Microbiology 1997; 35(3);719-723.

9. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. Lancet Infect Dis 2003; 3: 432-42.

10. Ainsa JA, Martin C, Gicquel B. Molecular approaches to tuberculosis. Mol Microbiol 2001; 42: 561-70.