ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/291697004

المضادات الحيوية : المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية

BOOK · AUGUST 2011

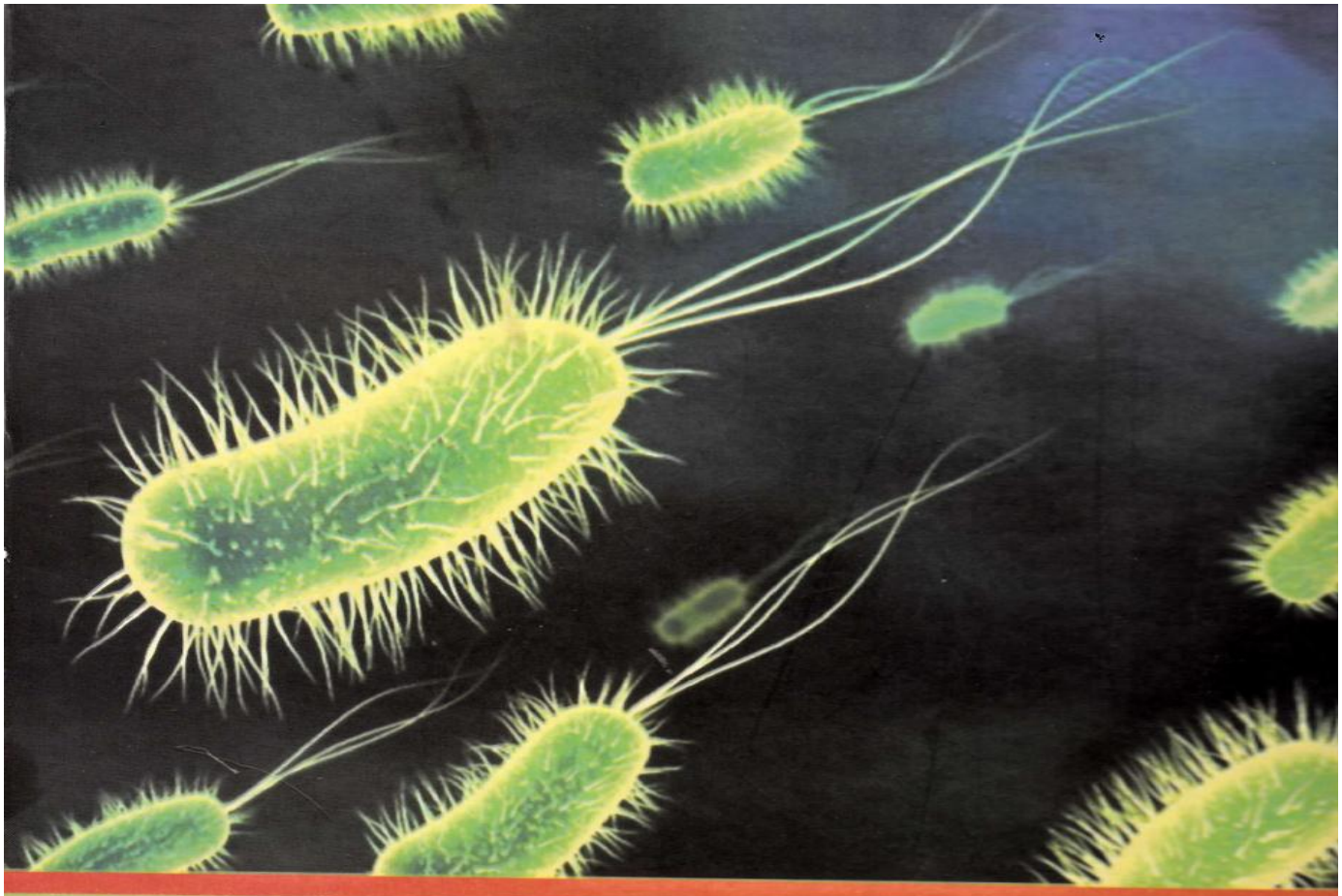
READS
75

1 AUTHOR:

Mohammed Al Marjani
Al-Mustansiriya University
45 PUBLICATIONS **2** CITATIONS

SEE PROFILE

Available from: Mohammed Al Marjani
Retrieved on: 26 February 2016



المضادات الحيويّة

المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية

الدكتور
محمد فرج المرجاني

www.dardjlah.com

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
الجامعة المستنصرية
كلية العلوم

المضادات الحيوية

المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية

الدكتور
محمد فرج المرجاني
أستاذ مساعد
قسم علوم الحياة

2011

بسم الله الرحمن الرحيم

وَالْعَصْرِ ﴿1﴾ إِنَّ الإِنسَانَ لَفِي خُسْرٍ﴿2﴾ إِلاَّ الَّذِينَ آمَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ وَتَوَاصَوْا بِالْحَقِّ وَتَوَاصَوْا بِالصَّبْرِ ﴿3﴾

صدق الله العظيم

سورة العصر

الأهداء

الى

الوالدين الكريمين
أخوتي وأخواتي الأعزاء
زوجتي الغالية د. جيهان
أولادي
مصطفى
مريم

محمد فرج المرجاني
2010

كلمة شكر

الحمد لله رب العالمين ... والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى أله الطيبين وأصحابه وجميع الأنبياء والمرسلين.

بعد حمد الله تعالى أتقدم بشكري وتقديري الى جميع أساتذتي ومن قبلهم جميع من قام بتعليمي منذ سنوات دراستي الأولى جزاهم الله عني خير الجزاء.

يعجز اللسان عن التعبير بما يكنه القلب من الشكر والتقدير الى الأساتذه د.سوسن ساجد محمد علي و د.سعد لعيبي حامد و د. جيهان عبد الستار للملاحظات القيمة التي أبدوها حول فصول الكتاب ، والدكتور عبد العزيز مجيد نخيلان لتشجيعه في أنجاز هذا الكتاب، والى الأخوه أشرف سامي و فهد مناف و عباس خضير الذين ساهموا في طبع هذا الكتاب لهم جميعا كل الشكر والتقدير.

محمد فرج المرجاني

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
المقدمة	9
الفصل الأول مقدمة عامة عن أهم مجاميع مضادات الحيوية	12
1- مقدمة عامة	12
2- مصادر مضادات الحيوية	13
3- مجاميع مضادات الحيوية المهمة	14
3-1 مضادات البيتالاكتام Beta- Lactams	14
3-1-1 البنسلينات Penicillins	14
أ- البنسلينات الطبيعية	15
ب- البنسلينات نصف المصنعة	16
3-1-2 السيفالوسبورينات Cephalosporins	18
3-1-2-1 سيفالوسبورينات الجيل الأول	18
3-1-2-2 سيفالوسبورينات الجيل الثاني	19
3-1-2-3 سيفالوسبورينات الجيل الثالث	19
3-1-2-4 سيفالوسبورينات الجيل الرابع	19
3-1-2-5 سيفالوسبورينات الجيل الخامس	20
3-1-3 الكلافام Clavams	20
3-1-4 المونوباكتام Monobactams	22
3-1-5 الكارباسيفيم Carbacephems	22
3-1-6 الكاربانيم Carbapenems	23
3-1-7 النوكاردسين Nocardicins	23
3-2 التتراسايكلينات Tetracyclines	23
3-3 الريفامايسينات Rifamycins	25
3-4 الأمينوكلايكوسايد Aminoglycosides	26
3-5 الماكروليد Macrolides	27
3-6 البوليببتيد Polypeptides	29
3-7 **الكلايكوببتيد Glycopeptides و Lipoglycopeptides**	29
الموضوع	**الصفحة**

	3-8 مضادات بكتيرية متنوعة Miscellaneous Antibacterial Antibiotics	31
	3-9 المضادات البكتيرية المصنعة	33
	3-9-1 السلفونومايدٍ Sulphonomides	33
	3-9-2 مشتقات Diaminopyrimidine	34
	3-9-3 Co-trimoxazole	34
	3-9-4 Dapsone	35
	3-9-5 مضادات Antitubercular	35
	3-9-6 مركبات النايتروفيوران Nitrofurans	36
	3-9-7 مجموعة الكوينولونات Quinolones	36
	3-9-8 مركبات الأميدازول Imidazole	38
الفصل الثاني	**مقدمة عن المادة الوراثية في الخلية البكتيرية**	39
	أولا- التركيب الكيميائي للأحماض النووية	39
	ثانيا- جينوم الخلايا بدائية النواة	43
	ثالثا- تضاعف DNA وتعبير الجين	45
	1- تضاعف DNA	45
	2- التعبير الجيني	52
	2-1 الأستنساخ	52
	2-2 الترجمة	60
الفصل الثالث	**البلازميدات والجينات المتنقلة**	68
	أولا البلازميدات البكتيرية	68
	1-1 أنواع البلازميدات	68
	1-2 الخواص الجزيئية للبلازميدات	70
	1-3 تضاعف البلازميدات	71
	1-4 ثباتية البلازميدات	73

الموضوع **الصفحة**

	ثانيا) الجينات المتنقلة	75
	2-1 تتابعات الأقحام Insersion Sequences	75
	2-2 القافزات Transposons	76
	2-3 الأنتكرونات Integrons	78
	2-4 القفز Transposition	78
	ثالثا) الأنتقال الأفقي للجينات	79
	3-1 الأقتران البكتيري	79
	3 -2 التحول البكتيري	85
	3-3 التوصيل (التنبيغ)	87
الفصل الرابع	**تأثير مضادات الحيوية في الخلية البكتيرية**	93
	1- تأثير المضادات في جدار الخلية البكتيرية	93
	1-1 تركيب جدار الخلية البكتيرية	93
	1-2 البناء الحيوي للببتيدوكلايكان	97
	1 -3 بروتينات PBPs	100
	1-4 مضادات الحيوية المثبطة لبناء الببتيدوكلايكان	101
	1-5 جدار بكتريا السل	106
	2- تاثير المضادات في غشاء الخلية البكتيرية	108
	2-1 تركيب غشاء الخلية البكتيرية	108
	2-2 المضادات المؤثرة في غشاء الخلية	109
	3- مثبطات بناء الأحماض النووية	111
	3-1 المركبات المؤثرة في بناء طلائع النيوكليوتيدات	111
	3-2 مثبطات Reverse transcriptases	114
	3-3 مثبطات ألأنزيمات المهمة في تضاعف DNA	114
	3-4 مثبطات أنزيم RNA Polymerase	116
	3-5 التداخل مع بناء الأحماض النووية	117

الموضوع **الصفحة**

الموضوع	الصفحة
4- مثبطات بناء البروتين	117
4-1 مثبطات تكوين aminoacyl-tRNA	118
4 -2 مثبطات مرحلة بدء الترجمة	118
4-3 مثبطات تكوين الأصرة الببتيدية وخطوة Translocation	120
الفصل الخامس مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية	125
1- أمتلاك حاجزالنفاذية	127
2- التثبيط الأنزيمي لمضادات الحيوية	129
2-1 الأنزيمات المحطمة لمضادات البيتالاكتام	129
2-1-1 أنزيمات البيتالاكتاميز للبكتريا الموجبة لصبغة كرام	130
2-1-2 أنزيمات البيتالاكتاميز للبكتريا السالبة لصبغة كرام	131
2-1-3 أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs	133
2-2 الأنزيمات المثبطه لمضاد الكلورمفنيكول	134
2-3 الأنزيمات المثبطه لمضادات الأمينوكلايكوسايد	135
2-4 الأنزيمات المثبطه لمضادات Streptogramins	136
3 - تحوير الموقع الهدف لعمل المضاد	136
3-1 مقاومة مضادات البيتالاكتام	136
3-2 مقاومة مضادات الماكروليد	137
3-3 مقاومة مضادات الكوينولون	138
3-4 مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسايد	139
3-5 مقاومة مضادات الريفامبسين	140
3-6 مقاومة مضادات السلفونومايد	140
4- مضخات الدفق Efflux Pumps	141
5- ميكانيكيات أخرى للمقاومة	143
5-1 زيادة أنتاج المواد التنافسية	143
5-2 فقدان فعالية المضاد	144
5-3 حماية الرايبوسوم ضد التتراسايكلين	145
5-4 مقاومة البكتريا للفانكومايسين	145
6- تنظيم مقاومة مضادات الحيوية	146

الفصل السادس الأساس الوراثي لمقاومة مضادات الحيوية 148

1- التطفير ودوره في مقاومة مضادات الحيوية 148

2- أصل جينات المقاومة المهمة سريريا 157

3- Mosaic genes 158

4- حركة الجينات وأنتقال مقاومة مضادات الحيوية 159

5- بلازميد المقاومة R 165

5-1 الأقتران البكتيري وأنتقال البلازميد R 166

5-2 الأهمية الطبية لبلازميد R 167

5-3 دور Transduction في مقاومة مضادات الحيوية 168

5-4 دور Transformation في مقاومة مضادات الحيوية 168

المصادر 170

الفهارس 211

المقدمة

تعد مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية أحدى المشاكل الصحية والأقتصادية على مستوى العالم ، مما دفع الباحثين الى التحري عن مضادات جديدة للتغلب على السلالات البكتيرية المقاومة والتي تزيد من نسبة الوفيات والوبائية .

يقدر خبراء الصحة أن هناك ما يقرب من 90.000 أنسان يموتون سنويا في الولايات المتحدة الأمريكية نتيجة الأصابة بالبكتريا المقاومة لمضادات الحيوية ، وأن الأصابة المكتسبة بالمستشفى تتطور لدى أكثر من 2 مليون أنسان سنويا ، وأن ثلاث أرباع هذه الأصابات تحدث نتيجة التعرض لبكتريا مقاومة لمضاد واحد على الأقل من المضادات الشائعة.

تقود الأصابة بالبكتريا المقاومة لمضادات الحيوية الى طول مدة مكوث المصاب بالمستشفى وزيادة خطورة الأصابة وأزدياد التكاليف الأقتصادية المباشرة الناجمة عن الأصابة بالبكتريا المقاومة لمضادات الحيوية ، على سبيل المثال : تكلف ألأصابات ببكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات عند مرضى المستشفيات 7.340 دولار أكثر مقارنة بتكاليف علاج المصاب بسلالة حساسة ، وتكون أصابة المرضى ببكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين خطرة قد تصل للوفاة وتكلف المستشفى ما يقرب من 4000 دولار أكثر مقارنة بتكاليف علاج المرضى المصابين بسلالة لبكتريا *S.aureus* حساسة للمضاد ، وتصل كلفة علاج بكتريا السل ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية الى 180.000 دولار او أكثر بينما تصل كلفة العلاج بالنسبة للسلالات الحساسة 2000 دولار ، وبصورة عامة تقدر الكلفة الكلية المرتبطة مع البكتريا المقاومة للمضادات ب 4- 5 مليار دولار سنويا في الولايات المتحدة الأمريكية .

أن الصراع مستمر بين البكتريا التي تطور مقاومتها لمضادات الحيوية باستمرار والباحثين الذين يعملون جاهدين لأيجاد مضادات فعالة جديدة ، لأن أي مضاد تم أدخاله للأستعمال الطبي ظهرت له مقاومة خلال 10 – 15 سنة وأحيانا أقل من ذلك . من جانب أخر فأن المستوى البطئ لأنتاج وتطوير مضادات جديدة مقارنة مع التطور السريع لمقاومة البكتريا لمضادات الحيوية يمكن أن يقود الى عصر ما بعد مضادات الحيوية (Post Antibiotic era) مما يعطي نظرة متشائمة . من الأمثلة على التطور السريع لمقاومة البكتريا للمضادات ما يلاحظ مع بكتريا *Streptococcus pyogenes* التي تمكنت من تطوير مقاومة لمضادي البنسلين والأرثرومايسين ، وبكتريا *Staphylococcus aureus* التي طورت مقاومة واسعة لمعظم المضادات الحديثة .

أستعمل مضاد البنسلين في العلاج لأول مرة بداية عقد الأربعينيات من القرن الماضي ، كانت نسبة المقاومة له بين سلالات بكتريا *S.aureus* بحدود 1% ، لكن في عام 1947 وجد ان 38 % من سلالات هذه البكتريا أصبحت مقاومه للبنسلين مما دفع بالباحثين الى محاولة أيجاد مضادات جديدة ، أستعمل مضاد المثيسلين كمضاد فعال ضد سلالات بكتريا *S.aureus* المقاومة للبنسلين سنة 1960 الأ أنه لم تمض سنوات حتى تطورت مقاومة لهذا المضاد الأمر الذي جعل من مضاد الفانكومايسين هو المضاد البديل ضد هذه البكتريا لكن في سنة 2002 عزلت بكتريا *S.aureus* مقاومه للفانكومايسين في ولاية Michigan في الولايات المتحدة الأمريكية .

كذلك طورت بكتريا *Salmonella enterica* DT04 مقاومة سريعة لمضادات السبروفلوكساسين والسيفالوسبورينات الحديثة ، وأنتشرت بكتريا السل ذات المقاومة المتعددة في المناطق التي توجد فيها بشكل عالي ، كل هذا يجعل الأصابة بهذه الممرضات صعبة وقد تكون مهددة لحياة الناس ، الأمر الأخر هو تطور البكتريا غير المرضية الى مرضية قادرة على أحداث أصابات متعددة ، وهذا يستوجب أستعمال واسع للمضادات الأمر الذي يزيد من فرصة تطور المقاومة.

من الأمثلة على بطئ تطوير أنتاج مضادات جديدة أنه تم أكتشاف سبعة أصناف من مضادات الحيوية في الفترة بين سنة 1936 الى سنة 1962 لكن خلال فترة 38 سنة لم يكتشف أي صنف جديد من المضادات .

من جانب أخر فأن تطور التقنيات الحديثة ، وزيادة الوعي الصحي وتدخل حكومات بعض الأقطار لتقليل نسبة أستعمال المضادات في الزراعة يقلل من النظرة المتشائمة حول مقاومة مضادات الحيوية ، فقد منع الأتحاد الأوربي سنة 1997 أستعمال مضاد avoparcin (مجموعة كلايكوببتيد) في تربية الحيوانات بعد عدة دراسات كشفت أن أستعماله في الزراعة يسبب زيادة ملحوظة في مقاومة البكتريا لهذه المضادات ، ومنعت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية أستعمال مضاد Enorfloxacin (شبيه السبروفلوكساسين) في تربية الدواجن سنة 2005 بعد أن كشفت الأبحاث ان بكتريا *Campylobacter jejuni* والتي تنتقل الى الأنسان من الدواجن أصبحت مقاومة لمضاد السبروفلوكساسين ، بينما لم تكن هناك مقاومة بين سلالات هذه البكتريا للمضاد قبل أستعمال Enorfloxacin سنة 1995 ، وقد وصلت المقاومة الى 20% للسبروفلوكساسين سنة 2004 .

من الستراتيجيات المهمة في الحد من مقاومة المضادات هي أستعمال المضادات الذكية التي تصمم لكي تركز على هدف معين مهم بالأستفادة من دراسة تتابعات الجينوم الكامل للبكتريا ومعرفة بروتينات أو أنزيمات فريدة في الخلية البكتيرية ثم تصميم مضاد قادر على تثبيط هذا الهدف مما قد يفتح بابا جديدا لأكتشاف مضادات فعالة جديدة.

الأمر الأخر المهم هو تطور اللقاحات ضد بعض البكتريا المقاومة للمضادات مثل بكتريا السل وبكتريا السيلان وبكتريا *S.aureus* و *Streptococcus pneumoniae* . وأستعمال عاثيات البكتريا

(Bacteriophages) في علاج بعض الأصابات البكتيرية بدل مضادات الحيوية كما في بعض دول أوربا. تعمل العاثيات بتخصص عال وتقوم بتحليل الخلية الهدف ، لكن المشكلة الرئيسية هي في تطوير بعض البكتريا مقاومة للعاثي عن طريق الطفرات الوراثية ، وقد يعمل الجهاز المناعي على تشخيص العاثي كونه جسم غريب فيتم تحطيم العاثي قبل ان يرتبط بالخلية البكتيرية ، لكن أستعمال العاثيات ضد الأصابات البكتيرية الجلدية يكون أمرا جيدا كون الجهاز المناعي أقل فعالية في هذه المناطق.

نظرا لأهمية دراسة موضوع مضادات الحيوية ولحاجة المكتبة العربية الى المصادر العلمية في هذا المجال دفعني ذلك الى المساهمة في أعداد هذا الكتاب وكلي أمل أن أكون قد ساهمت في تقديم معلومات عن هذا الموضوع . يتضمن الكتاب ثلاث محاور عامة يتطرق أولها الى أهم مجاميع مضادات الحيوية وألية تأثيرها في الخلية البكتيرية وطرق مقاومة البكتريا لها. يتضمن المحور الثاني فهم تركيب المادة الوراثية وتضاعف DNA وعملية التعبير الجيني ، وطرق أنتقال المادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية ودور البلازميدات في ذلك ، أما المحور الثالث فيتضمن الأساس الوراثي لمقاومة البكتريا لمضادات الحيوية ، وقد أستعملت مصطلح مضادات الحيوية ليشمل المضادات الحيوية والجرثومية ، ولصعوبة عرض كل هذه المواضيع بالكامل في كتاب من جزء واحد لذا فأن بعض النقاط التفصيلية قد تم استبعادها بهدف الأختصار.

والله الموفق للصواب...

محمد فرج المرجاني

الفصل الأول

مقدمة عامة عن أهم مجاميع مضادات الحيوية

1- مقدمة عامة :

تعرف مضادات الحيوية بأنها من النواتج الأيضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الأحياء المجهرية، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الأحياء المجهرية المختلفة ولها القدرة على تثبيط نمو الأحياء المجهرية الأخرى دون التأثير على خلايا الجسم، وهي تشمل المنتجات المستحصلة بواسطة التحوير الكيمياوي للمضادات الطبيعيّة وغيرها من منتجات الأيض المايكروبي أو بواسطة التحوير المايكروبي للمواد المصنعة.

تمتلك بعض المضادات طيفا ضيقا وتكون متخصصة بكائن معين أو مجموعة معينة من الأحياء المجهرية أي تكون Narrow spectrum antibiotics ، أما المضادات التي لها طيف واسع ضد الأحياء المجهرية مثل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فتدعى Broad spectrum antibiotics . تكون بعض المضادات ذات فعالية قاتلة (Bacteriocidal) للبكتريا أذ تؤثر بشكل فعّال على حيوية الخلية البكتيرية مما يؤدي الى قتلها ولا يتكوّن جيل جديد عند زوال المؤثر، أو تكون ذات فعالية مثبطة (Bacteriostatic) تثبط نمو البكتريا ولا تقتلها فيبقى عددها ثابت طيلة فترة تعرضها للمضاد وعند زوال المؤثر يمكن للبكتريا أن تنمو من جديد وتتكاثر.

تختلف مضادات الحيوية في أوزانها الجزيئية، وهي تحتوي على مجاميع عضوية فعالة ، وتشترك جميع مضادات الحيوية بكونها مواد عضوية صلبة.

تستعمل مضادات الحيوية لعلاج الألتهابات الجرثومية المختلفة كما تستعمل في قطاع الإنتاج الحيواني والزراعي وتستعمل كمواد حافظة لبعض أنواع الأغذية خاصة المعلبات ، إضافة لذلك فإنها تستعمل كمثبطات لبعض التفاعلات الكيميائية.

تخلط المضادات أحيانا مع بعضها للحصول على فعل تأزري لغرض زيادة **القابلية التثبيطية** للمضاد لعلاج الأصابات المهمة مثل ألتهاب بطانة القلب المتسبب عن بكتريا *Enterococcus* وعلاج الأصابات المختلطة مثل علاج الخراج البطني المتسبب عن بكتريا هوائية ولا هوائية فيخلط مضاد Nitronidazole مع مضادات الأمينوكلايكوسايد أو السيفالوسبورينات واسعة الطيف ، **ولتقليل السمية** مثلا عند علاج أصابات خميرة *Cryptococcus neoformans* بمضاد Amphotericin B يخلط مع 5-flucytosine لتقليل سمية الأمفوترسين بتقليل الجرعة. ومن فوائد خلط المضادات ايضا هو لمنع تطور المقاومة أثناء العلاج مثلا عند استعمال Fusidic acid لعلاج أصابات بكتريا *S.aureus* يفضل خلطه مع

Flucloxacillin لمنع تطور سلالات مقاومة من هذه البكتريا . كذلك عند علاج بكتريا السل بمضاد الريفامبسين يخلط مع Isoniazed لكي لا تتطور المقاومة عند أستعمال الريفامبسين لوحده . لكن لخلط المضادات بعض السلبيات تتمثل في زيادة الأثار الجانبية للمضادات المستعملة .

من الصفات المهمة للمضاد الحيوي الجيد ان لا يمتلك سمية أو تكون سميته قليلة وأن لا يؤثر على بروتينات الجسم، وأن لا يعمل على رفع درجة حرارة الجسم ولا يؤثر على عملية البلعمة (Phagocytosis)، وأن تكون له قابلية الذوبان في الماء و سوائل الجسم.

2- مصادر مضادات الحيوية

أ) الأحياء المجهرية:

تشمل البكتريا مثل جنس *Bacillus* التي ينتج منها مضادات باستراسين و بولمكسين و كولستين ومن أنواعها المهمة *B.subtilis* و *B.brevis* و *B.polymyxa* .

* بكتريا *Pseudomonas acidophila* و أنواع *Gluconobacter* ينتج منها مضادات Monobactams .

* البكتريا الخيطية (Actinomycetes) ينتج منها مضادات كانامايسين و ريفامبسين و فانكومايسين و تتراسايكلين و أرثرومايسين و ستربتومايسين و كلورمفنكول . مثالها بكتريا *Streptomyces*.

* ينتج الجنتامايسين من *Micromonospora purpurea*

* تنتج من فطريات *Penicillium* و *Acremonium* مضادات البنسلين والسيفالوسبورين.

ب) **مضادات مصنعة (Synthesis):** تنتج بعض المضادات بعملية تصنيعية مثل مضاد الكلورمفنيكول.

ج) **نصف مصنعة (Semi synthetic):** وتعني أن جزءاً من جزيئة المضاد ينتج بعملية التخمير من الأحياء المجهرية ثم يحوّر الناتج بعملية كيميائية. تنتج بعض البنسلينات و السيفالوسبورينات بهذه الطريقة.

تنتج المضادات (كأحد نواتج الأيض الثانوية) عندما يصل الكائن المنتج الى طور Idiophase (idiolites) في نهاية الطور اللوغارتمي.

3- مجاميع مضادات الحيوية المهمة

3-1 مضادات البيتالاكتام

تضم هذه المجموعة من المضادات عدة مجاميع فرعية هي :

3-1-1 البنسلينات Penicillins

3-1-2 السيفالوسبورينات Cephalosporins

3-1-3 الكلافام Clavams

3-1-4 المونوبكتام Monobactams

3-1-5 الكاربسيفام Carbacephems

3-1-6 الكاربنيم Carbapenems

3-1-7 النوكاردسين Nocardicins

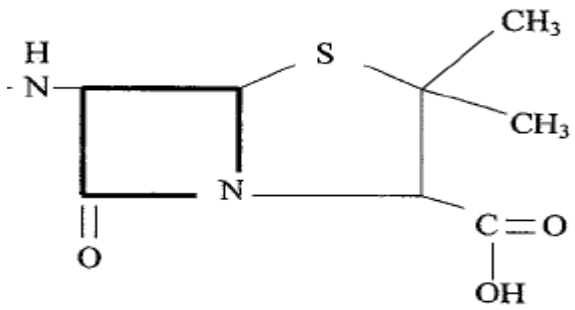
3-1-1 البنسلينات

أكتشف البنسلين من قبل ألكسندر فلمنك (Alexander Fleming) بالصدفه أثناء دراسته على بكتريا *S.aureus* في سنة 1928 في احدى مستشفيات لندن ، أستخلص فلمنك مواد خام من العفن الذي يدعى الأن *Penicillium notatum* ووجد ان هذه المواد تقتل أنواع مختلفه من البكتريا المرضيه ، لكنه لم يتمكن من تنقية كميات كافيه من البنسلين . في سنة 1938 أستطاع ثلاث باحثين بريطانيين هم Florey و Chain و Heatley من أنتاج كميات كبيرة من البنسلين .

أنتقل Florey و Heatley سنة 1941 الى الولايات المتحدة الأمريكية أثناء الحرب العالمية الثانية وعملوا على أنتاج كميات كبيرة من البنسلين وأستعمل البنسلين في علاج الجنود الجرحى سنة 1943- 1944.

من الطريف ان أول شخص تم معالجته بالبنسلين المنقى في لندن سنة 1941 هو الكسندر البرت (عمدة لندن أنذاك) بعد تعرضه لجروح خطيرة أثناء الحرب بعد عدم تحسن حالته بأستعمال مركبات السلفونومايد ، في بداية العلاج بالبنسلين تحسنت حالته لكنه توفي بعد خمسة أيام من ترك العلاج نتيجة نشاط بكتريا *S.aureus* وانتاجها السموم . اما الاستعمال الأول للبنسلين في امريكا فقد كان ناجحا فقد استعمل لعلاج أمرأة مصابة ببكتريا *Streptococcus* .

يتألف البنسلين من حلقة Thiazolidine مرتبطة مع حلقة β-Lactam وهي نواة البنسلين (6-aminopenicillinic acid) التي ترتبط بسلسلة جانبية، وأن اضافة مجاميع كيميائية لهذه السلسلة الجانبية يقود الى الحصول على مشتقات جديدة تدعى شبه مصنعة (Semi synthetic).



شكل 1 : نواة البنسلين (6-aminopenicillinic acid) التي تتألف من حلقة Thiazolidine مرتبطة مع حلقة β-Lactam.

تقسم البنسلينات إعتماداً على نوعية السلسلة الجانبية وفعاليتها ضد المايكروبية الى :

أ- **البنسلينات الطبيعية (Natural Penicillins)** : تشمل البنسلينات التي تنتج بالتخمر من أعفان *Penicillium notatum* و *P.chrysogenum*

مثالها **بنسلين G** (benzyl Penicillin) وهو لا يعطى فموياً إنما بالحقن أذ يتأثر بحموضة المعدة ، ويتأثر بأنزيمات البيتالاكتاميز، ويستعمل لعلاج التهابات مختلفة مثل تسمم الدم وذات الرئة والسيلان. يمتص بسرعة ويفرز بسرعة لذا يخلط مع مركبات أخرى مثل benzathine و procain و benthamine لإطالة مدة بقائها في الدم

بنسلين V (Phenoxy methyl penicillin) يعطى فموياً لعدم تأثره بالعصارة المعدية وهو أقل فعالية من بنسلين G ويعد الخط العلاجي الأول للإلتهابات المصاحبة لتكون الأسنان (إصابات Odontogenic).

ب- البنسلينات نصف المصنعة (Semi-synthetic penicillins) :

نجح فريق من الباحثين سنة 1959 بعزل نواة البنسلين (6-aminopenicillinic acid) (6APA) ، ويمكن عزل هذه النواة من وسط التخمير

الذي ينمو فيه العفن أو بأستخدام أنزيمات تزيل السلسلة الجانبية مثل (acylases) penicillin amidases الذي يزيل السلسلة الجانبية من البنسلين G ومن أمثلة البنسلينات نصف المصنعة:

1- مجموعة Narrow-spectrum pencillinase resistant penicillins :

تكون مقاومة لأنزيمات Penicillinases ومنها مضادات Methicillin و Nafcillin و Dicloxacillin و Cloxacillin وهي متخصصة ضد أصابات البكتريا الموجبة لصبغة كرام خاصة بكتريا *S.aureus* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز لذا تدعى هذه المضادات Anti Staphylococcal penicillins وهي مهمة لعلاج إصابات الجلد المسببة عن بكتريا *S.aureus* والإصابات التنفسية.

2- مجموعة Narrow spectrum β-Lactamase resistant penicillins :

تمتلك فعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ولا تؤثر على بكتريا *Acinetobacter* و *Pseudomonas* ، مثال هذه المضادات Temocillin وهو أول بنسلين مقاوم بصورة كاملة لأنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من البكتريا السالبة لصبغة كرام.

مضاد (6-β amidino penicillinic acid) يملك فعالية ضد بكتيرية عالية ويكون فعال ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ولا يمتلك فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام.

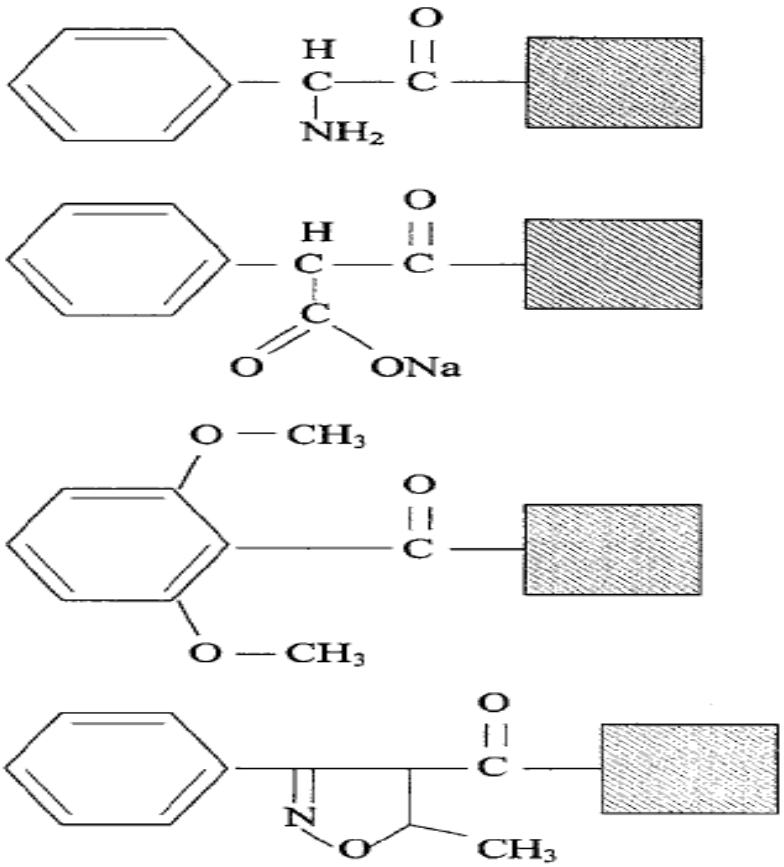
3- مجموعة Amino-penicillins (Moderate-spectrum penicillins) :

تضم مضادات الأمبسلين و الاموكزسلين التي تملك القدرة على أختراق الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية، يستعمل الأمبسلين في علاج التهابات المجاري البولية والإذن الوسطى والإصابات التنفسية وتكون بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ومعظم أنواع بكتريا *Klebsiella* مقاومة له.

يكون مضاد الأموكسسلين فعّال ضد بكتريا *Streptococcus pneumoniae* الحساسة للبنسلين وبكتريا *S.aureus* غير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز وضد بكتريا *Haemophilus influenzae* و *E. coli*.

4- البنسلينات واسعة الطيف (Extended-spectrum penicillins)

تكون فعالة ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وتشمل هذه المضادات **Carboxy-penicillins** مثـل Ticarcillin و Carbencillin و **Ureido-penicillins**(**acylamino Penicillins**) مثل Azlocillin و Mezlocillin و Piperacillin التي تكون حساسة لأنزيمات البنسلينيز و تتأثر بالحوامض المعدية .



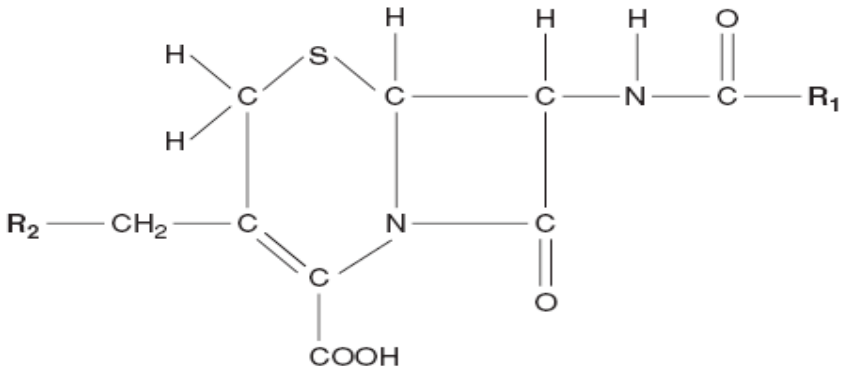
شكل 2 : بعض مضادات البنسلينات نصف المصنعه وهي بالترتيب من الأعلى : الأمبسلين و الكاربنسلين و المثسلين و الأوكساسلين. (يمثل المربع عن اليمين نواة البنسلين).

3-1-2 السيفالوسبورينات

وجـد أن الفطـر *Acremonium cephalosporium* (كـان يسـمى *Cephalosporium acremonium*) ينـتج Cephalosporin C و Cephalosporin N و Cephalosporin P التي تحوي حلقة dihydrothiazine

مرتبطة مع حلقة البيتالاكتام ومجاميع جانبية R_2 و R_1 تتغير للحصول على مشتقات جانبية.

تعتمد فعاليتها ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام على ألفة المضاد للأنزيمات الحساسة للبنسلين (PBPs) وضد البكتريا السالبة لصبغة كرام على اختراقها للغلاف الخارجي ومقاومتها لأنزيمات البيتالاكتاميز الموجودة في الفسحة البيربلازمية وأرتباطها بأنزيمات PBPs.



شكل 3 : نواة السيفالوسبورينات (7-amino-cephalosporanic acid).

تكون هذه المضادات واسعة الطيف قليلة السمية أمينة الاستعمال، يمكن الحصول منها على مشتقات عديدة بأجراء تحويرات جانبية ومن هذه المضادات :

3-1-2-1 سيفالوسبورينات الجيل الأول :

تضم مضادات Cephaprine و Cephacetrile و Cephazolin و Cephalothin التي يتم الحصول عليها بإضافة مركبات 3-acetomethyl . تؤخذ هذه المضادات عن طريق الحقن وهي ضيقة الطيف وهناك مضادات تعطى فموياً مثل Cephalordineو Cephalexin (Keflex) تستعمل لعلاج إصابات المجاري البولية والتنفسية. تتكسر هذه المضادات داخل الجسم الحي بأنزيمات esterases لتتحول الى مشتق أقل فعالية ضد بكتيرية هو 3-hydroxymethyl وهي تطرح بسرعة خارج الجسم، واستبدلت بمجاميع أكثر استقراراً وأقل مهاجمة بأنزيم الأستريز مثل Cephaloridine. تكون مضادات Cefamandole و Cephaprine قليلة الفعالية ضد بكتريا *E.coli* لأنها قليلة الألفة لأنزيمات PBPs.

3-1-2-2 سيفالوسبورينات الجيل الثاني :

تمتلك هذه المضادات فاعلية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، ويتم الحصول عليها بإضافة مركبات Iminomethoxy ، مثالها مضاد Cefuroxime الثابت ضد أنزيمات البيتالاكتاميز المتواسطة بالبلازميدات وهي فعالة ضد بكتريا *Neisseria gonorrhoeae* و *Haemophilus influenzae* .

يستعمل مضاد Cefaclor ضد إصابات ذات الرئة والأذن والحنجرة والجلد والتهاب المجاري البولية.

3-1-2-3 سيفالوسبورينات الجيل الثالث :

تضم مضادات Ceftazidime و Ceftriaxone و Cefotaxime والتي تملك ألفة لأنزيمات PBPs للبكتريا السالبة لصبغة كرام وبكتريا *Streptococcus* . تؤخذ عن طريق الحقن ضد إصابات الجهاز التنفسي والجلد والمجاري البولية والمفاصل والعظام والسحايا وتسمم الدم ، يكون مضاد Ceftazidime فعال ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* والعائلة المعوية ، ولا يستعمل لعلاج إصابات البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، يستعمل مضاد Ceftriaxone مع مجموعة مضادات Aminoglycosides و Macrolides لعلاج إصابات ذات الرئة والسحايا.

3-1-2-4 سيفالوسبورينات الجيل الرابع :

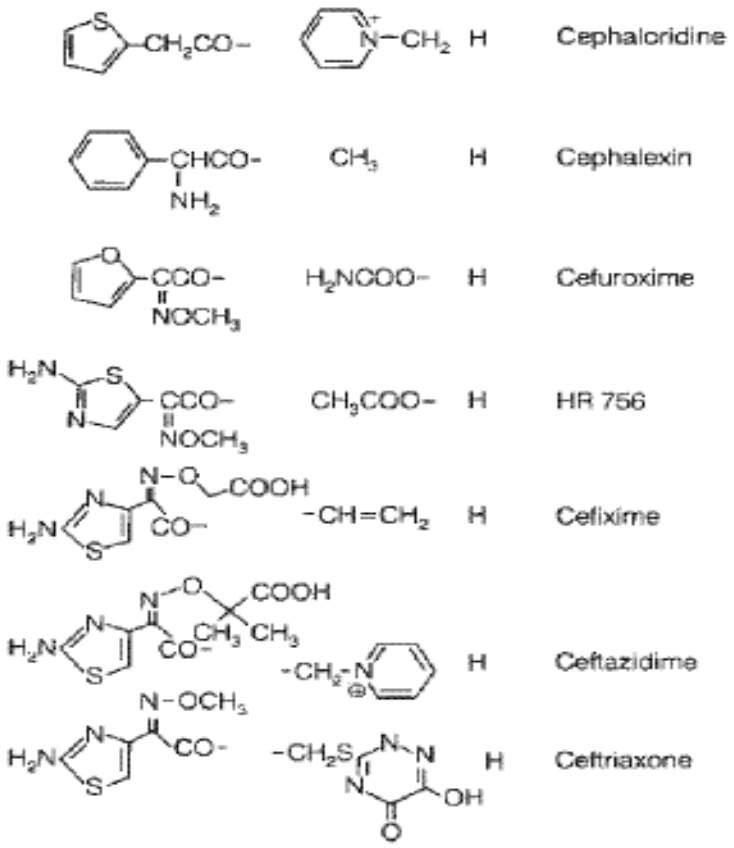
يمتلك مضاد Cefepime (مثال هذه المجموعة) طيفا واسعا ضد البكتريا وهو فعّال ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لعلاج ذات الرئة ، وضد بكتريا *Streptococcus pneumoniae* و *S.aureus* وضد أفراد العائلة المعوية المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز.

يكون مضاد Cefpirome (المثال الأخر على هذه المجموعةً) فعالا ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Pseudomonas aeruginosa* والموجبة لصبغة كرام مثل *Staphylococcus* وهو مقاوم لأنزيمات البيتالاكتاميز

يستعمل مضاد Cefquinome في المجال البيطري أكثر من السريري .

3-1-2-5 سيفالوسبورينات الجيل الخامس

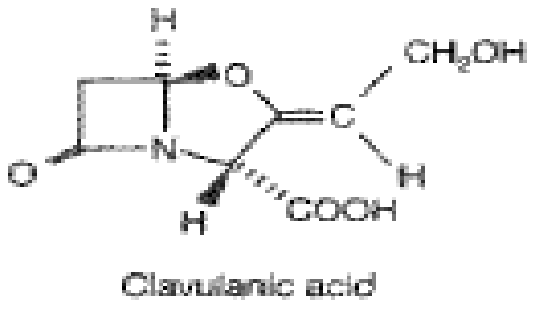
مثالها مضاد Ceftobiprole ذو الفعالية ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) وبكتريا *Streptococcus pneumoniae* المقاومة للبنسلين، يعطى بالحقن لعلاج إصابات الجلد والأنسجة الرخوة.



شكل 4 : بعض مضادات السيفالوسبورينات (نلاحظ المجاميع الجانبية R1 و R2 مرتبطة بنواة السيفالوسبورين طرف H)

3-1-3 مضادات Clavams

تختلف عن البنسلينات في التركيب بوجود أوكسجين في حلقة Clavam oxazolidine . ينتج مركب Clavulanic acid من *Streptomyces clavuligerus* ويمتلك فعالية ضد بكتيرية ضعيفة لكنه يعد مثبطا لأنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من بكتريا *Staphylococcus* والبنسلينيز المنتج من البكتريا السالبة لصبغة كرام.



Clavulanic acid

شكل 5 : حامض الكلافيولانك.

أن أكتشاف حامض الكلافيولانك (Clavulanic acid) فتح الطريق للفعل التأزري مع المضادات الحساسة لأنزيمات البيتالاكتاميز مثل الامبيسلين والاموكزسلين ، بالرغم من ان هذه المثبطات تمتلك فعالية ضد مايكروبيه قليلة لوحدها الا أنها تعمل على زيادة كفاءة المضاد الحيوي بعد الخلط معه بنسب معينه. هناك مثبطات أخرى أضافه لحامض الكلافيولانك مثل Sulbactam و Tazobactam ، وهي تعمل بصورة غيرعكسية مع serine (عند الموقع الفعال) لتكون معقد ثابت غير فعال أنزيميا . تشبه هذه المركبات من الناحية التركيبية مضادات البيتالاكتام أذ تمتلك حلقة البيتالاكتام .

من الامثلة على استعمال خلط المثبطات مع المضادات:

:Augmentin

يتألف من خلط Clavulanic acid مع مضاد الاموكزسلين لزيادة طيف فاعلية المضاد ضد البكتريا المقاومة للاموكزسلين والمنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وهو يستعمل لعلاج الاصابات التنفسية كشراب او بشكل حبوب كذلك علاج اصابات المجاري البولية والتناسلية .

تشير الدراسات التي أجريت خارج الجسم الحي أن حامض الكلافيولانك يزيد فعالية مضاد البيتالاكتام ضد بكتريا *Streptococcus pneumoniae* من خلال تآزره مع المضاد للأرتباط مع أنزيمات PBP3 و PBP2 مما يسبب شكل غير منتظم للخلايا يختلف عن شكل الخلايا غير المعرضه له ، وجد أن شكل الخلايا بوجود الأموكزسلين لوحده او الكلافيولانك لوحده لا يتغير مقارنة بخلايا مزروع السيطرة.

:Timentin

يتالف من خلط Clavulanic acid مع مضاد Ticarcillin لعلاج أصابات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Haemophilus influnzae* كذلك يكون هذا الخليط فعال ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* ، ووجد أن الكلافيولونك لوحده كفوء ضد هذه البكتريا وعند خلطه مع الأموكزسلين او Ticarcillin يكون له فعل تأزري للأرتباط بأنزيم PBP ، وفي داخل الخلايا يكون الكلافيولونك أكثر كفاءه من الأموكزسلين او Ticarcillin ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* مما يدل على ان الكلافيولونك يخترق الخلايا أسرع من البنسلينات .

Unasyn:

يتالف من خلط Sulbactam مع مضاد الامبسلين لعلاج الاصابات الجلدية والتناسلية وذات الرئة.

3-1-4 مضادات Monobactams

تعد من مضادات البيتالاكتام أحادية الحلقة (Monocyclic) ، تنتج من سلالات بكتيرية مثل *Chromobacterium violaceum* ، نواتها 3-amino mono bactamic acid (3AMA) مثالها مضاد Aztreoname ذو الفعالية العالية ضد معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ويكون غير فعال ضد سلالات *S.aureus* و *Bacteroides fragilis* لأن أرتباطه يكون ضعيف بأنزيمات PBPs لهذه البكتريا . يعطى هذا المضاد حقنا لأنه ضعيف الامتصاص بالقناة المعوية ، ويكون مقاوم لأنزيمات البيتالاكتاميز ويثبط بأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESβLs).

3-1-5 مضادات 1-Carbacephems

تستبدل فيها ذرة الكبريت في حلقة Thiozolidine بالكاربون مثالها مضاد Loracarbef الفعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Staphylococcus* وهو يعطى فموياً.

3-1-6 مضادات Carbapenems

من أمثلة هذه المجموعة Olivanic acid و Thienamycin و Imipenem .
ينتج Olivanic acid من *Streptomyces olivaceus* وهو واسع الطيف ويعد مثبط كفوء لمختلف أنواع أنزيمات البيتالاكتاميز .

Thienamycin واسع الطيف مقاوم لأنزيمات البيتالاكتاميز ينتج من *S. cattleya*.
يكون مضاد Imipenem مقاوم لمعظم أنزيمات البيتالاكتاميز لكن يتحطم بالأنزيم الكلوي dehydropeptidase عندما يعطى لوحده لذا يعطى مع مركب Cilastatin لمنع هذا التثبيط. وهذا المضاد فعال ضد بكتريا *Ps.aeruginosa* وأنواع جنس *Enterococcus* وغير فعال ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين.
يمتاز مضاد Meropenem بطيف واسع جداً يعطى حقناً بالوريد لعلاج إصابات عديدة مثل السحايا وذات الرئة.
تكون هذه المضادات قاتلة للبكتريا ما عدا كونها مثبطة ضد بكتريا *Listeria* .
هناك مضادات أخرى تعود لهذه المجموعة مثل Faropenem و Doripenem و Ertapenem.

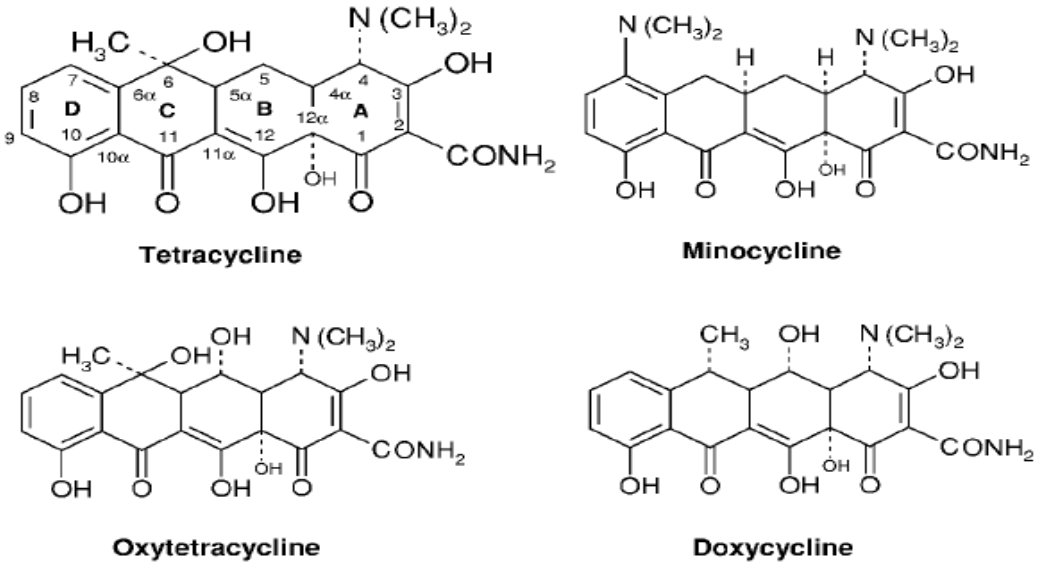
3-1-7 مضادات Nocardicins

تشمل عدة مضادات تعزل من *Nocardia* مثل Nocardicin A الفعال ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام لكنها غير فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام.
من التأثيرات الجانبية لمضادات البيتالاكتام هي تفاعلات فرط الحساسية (Hypersensitivity) مثل الحساسية الآنية (immediate) والمتأخرة (delayed) وتفاعلات Serum-sickness وتفاعلات التآق (anaphylactic) ويمكن أن يحصل عند بعض الأشخاص التهاب القولون الكاذب (Pseudomembranous colitis) .

3-2 مجموعة Tetracyclines

مجموعة من المركبات المهمة طبياً تنتج من بكتريا *Streptomyces* تتكون من أربع حلقات بنزين تحوي مواقع R_3 و R_2 و R_1 يمكن أن تضاف لها جذور كيميائية للحصول على مشتقات نصف مصنعة مثالها:

Tetracycline , Chlorotetracycline , Oxytetracycline , Minocycline , Doxycycline , Thiacycline , Clomocycline , Methacycline , Demethyl Chlortetracycline.



شكل 6 : بعض مضادات التتراسايكلينات.

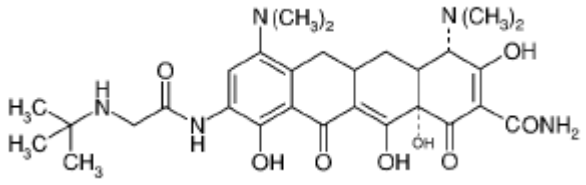
مضادات Clomocycline و Tetracycline هي من Chlortetracyclines تنتج من بكتريا *Streptomyces aureofaciens*

يشتق مضاد Methacycline من Oxytetracyclins وينتج من *S.rimosus* ينتج مضاد Demethylchlortetracycline من سلالة طافرة لبكتريا *S.aureofaciens* ، أما مضاد Minocyclin فيشتق من Tetracycline.

تكون هذه المضادات واسعة الطيف ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، تمتص في الأمعاء، وتكون فعّاله ضد بكتريا *Streptococcus pneumoniae* والريكتسيا والمايكوبلازما والكلاميديا وبكتريا السفلس *Treponema* ، ويستعمل لعلاج حمى مالطا المتسبب عن بكتريا *Brucella* وضد الكوليرا ، وتكون بكتريا *Ps.aeruginosa* أقل حساسية له، لكن التراكيز العالية التي يصلها المضاد بالمرارة تجعله فعال ضد هذه البكتريا .

مضـادات Glycylcyclines مـن التتراسـايكلينات الجديـدة ذات الفعاليـة ضـد البكتريـا المقاومة للتتراسايكلينات القديمة.

مضـاد Tygacil (Tigecycline) يكون أكثر فعالية من مضـاد Minocycline ضـد البكتريـا المقاومـة للتتراسـايكلين ، أسـتعمل فـي الولايـات المتحـدة الأمريكيـة سـنة 2005.



شكل 7: مضاد Tygacil

من التأثيرات الجانبية لمضادات التتراسايكلينات أضطرابات الجهاز الهضمي وتقيء وغثيان قد تسبب فرط الحساسية، لا يجوز اعطاؤها للمرأة الحامل لأنها تعبر المشيمة وتؤثر على العظام وتسبب أصفرارها.

3-3 مضادات Rifamycins

تتألف من مجموعة مضادات (من A الى E)، منها مضاد Rifampicin الذي يملك فعالية قاتلة للبكتريا ويكون فعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام وضد بكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis* وبعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام (لكن غير فعال ضد العائلة المعوية وبكتريا *Ps.aeruginosa*) يعطى فموياً وهو يصل الى سائل النخاع الشوكي ويستعمل لعلاج السحايا ومرض السل، يكون قاتل بتراكيز قليلة ضد بكتريا *S.aureus*.

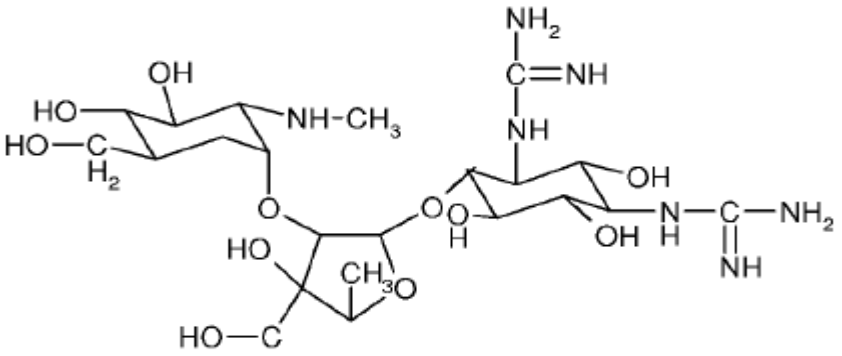
تنشأ طفرات مقاومة له بسرعة لذلك يخلط مع مضاد Vancomycin لعلاج أصابات بكتريا *S.aureus* .

من المضادات الحديثة rifabutin يستعمل للوقاية من أصابات بكتريا *M.avium* في المرضى المثبطين مناعيا وفي علاج أصابات بكتريا *Mycobacterium* عدا مرض السل.

4-3 مضادات Aminoglycosides

مجموعة من المضادات تحوي سكريات أمينية في تركيبها ، ومن هذه المضادات:
Neomycin و Framycetin و Tobramycin و Streptomycin
Gentamycin و Kanamycin و Amikacin و Netilmicin و Sisomicin .

*عزل مضاد Streptomycin من قبل Waksman سنة 1944 وأستعمل في علاج مرض السل وهو ينتج من *Streptomyces griseus* ، وبالرغم من ظهور مقاومة له وأمتلاكه أثارا جانبية الأ انه يبقى علاج مهم ضد السل وهو يستعمل خلطاً مع P(4)-aminosalicylic acid و Rifampicin و Isoniazed ، وهو فعال ضد مختلف البكتريا السالبة لصبغة كرام وبعض سلالات *S.aureus* وضد *Enterococcus* وهو يخلط مع البنسلين لعلاج التهاب بطانة القلب وخلطاً مع التتراسايكلين لعلاج حمى مالطا والطاعون ، وتكون البكتريا اللاهوائية مقاومة له.



شكل 8 : مضاد الستربتومايسين.

* Gentamycin (Garamycin) : خليط من ثلاث مركبات هي C_2 و C_{1a} و C_v فعال ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مثل سلالات *Ps.aeruginosa* ، تزداد فعاليته في pH بحدود 8 يعطى خلطاً مع مضاد Carbencillin لتأخير تطور المقاومة له. يستعمل حقناً أو بشكل مرهم للإصابات الجلدية خاصة الحروق والجروح الناجمة عن بكتريا *Ps.aeruginosa* و *S.aureus*.

*Kanamycin مضاد معقد من ثلاث مركبات C و B و A فعّال في تراكيز قليلة ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام من ضمنها بكتريا *S.aureus* المقاومة للبنسلين

والبكتريا السالبة لصبغة كرام ، يعد هذا المضاد من مضادات الخط الثاني لعلاج مرض السل.

*Paromomycin مضاد مهم في علاج إصابات الأميبا (قاتل لطفيلي *Entamoeba histolytica*) و الزحار العصوي الحاد.

*Neomycin مضاد ضعيف الامتصاص بالقناة المعوية عند إعطاءه بالفم ويستعمل كغسيل أو مرهم جلدي لإصابات الجلد والعيون، يتكوّن من مركبان Neomycin A و B يخلط المركبان للحصول على Framycetin الذي يستعمل موضعياً. كذلك يستعمل خلطاً مع مركبات أخرى لتقليل نسبة حاملي المكورات العنقودية في الأنف بين الكادر الطبي في المستشفيات. يعطى عن طريق الفم قبل العمليات الجراحية لتقليل أعداد البكتريا الطبيعية في الأمعاء.
تكون الأجيال الحديثة من الأمينوكلايكوساید ذات فعالية ضد بكتيرية أكثر وهي مستقرة ضد الأنزيمات المحورة للأمينوكلايكوساید. يتم تحوير Kanamycin B ليعطي مضاد Tobramycin (3¯deoxy Kanamycin B) الأكثر فعالية والأوسع طيفا.

* مضاد Amikacin مشتق من Kanamycin ويكون أكثر مقاومة لمعظم الأنزيمات المحورة للأمينوكلايكوساید.
*Netilmicin (AF-ethylsisomicin) : مشتق نصف مصنع لمضاد Sisomicin لكنه أقل حساسية من Sisomicin لبعض الأنزيمات البكتيرية المحورة.
تمتلك مجموعة الأمينوكلايكوساید تأثيرات جانبية خاصة اذا أستمر العلاج لفترة طويلة فهي سامة للعصب الثامن للسمع، وسامة للكلية.

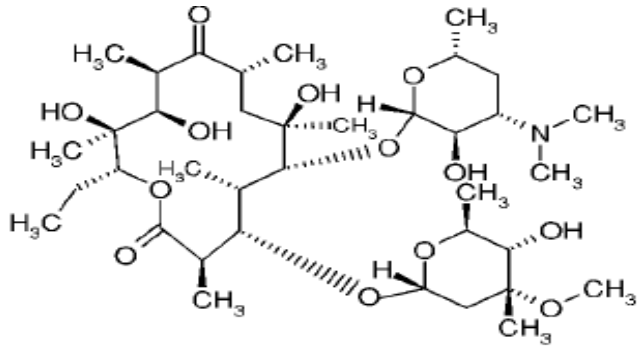
3-5 مجموعة Macrolides

تضم العديد من المضادات واسعة الطيف، تتكون من حلقة كبيرة من Macrocyclic Lacton ring مرتبط بها سكر سداسي وهناك مواقع جانبية R_1 , R_2 , R_3 , R_4 تضاف لها جذور كيميائية لأنتاج مشتقات جديدة.

تضم **المجموعة القديمة** مضادات :

Triacetyloleandomycin و Spiramycin و Oleandomycin و Erythromycin.

ينتج مضاد Erythromycin من بكتريا *Streptomyces erythrus* وهو فعال ضد معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبكتريا *Neisseriae* و *Haemophilus influnzae* و *Legionella pneumophila* ، لكنه غير فعال ضد بكتريا العائلة المعوية.



شكل 9 : مضاد الأرثرومايسين.

تعتمد فعاليته على pH الوسط ، وهو يستعمل لعلاج الالتهابات التنفسية بدل البنسلين عند الأشخاص الذين لديهم فرط الحساسية للبنسلين.

يكون مركب Erythromycin estolate أكثر ثبوتية بالعصارة المعدية، وتكون بكتريا *S.aureus* أقل حساسية للارثرومايسين من بكتريا Pneumococcus أو haemolytic Streptococcus وقد تطورت مقاومة سريعة لهذا المضاد عند بكتريا *S.aureus* إلا أن مقاومته لا تعد مشكلة طبية.

تمتلك مضادات Spiramycin و Oleandomycin مدى متشابه في الفعالية للارثرومايسين لكنها تكون أقل فعالية، هناك مقاومة مشتركة (Cross-resistance) تحصل بين هذه المضادات.

وتضم **المجموعة الحديثة :**

مركبات نصف مصنعة تختلف عن المركب الأصلي في الارتباط بحلقة Lacton. وهي مشتقة من الارثرومايسين مثالها Roxithromycin و Clarithromycin و Dirithromycin و Azithromycin .

يشبه مضاد Roxithromycin بفعاليته مضاد الارثرومايسين في الزجاج (*In vitro*) لكن يدخل خلايا الدم البيض و Macrophage بتراكيز عالية وبسرعة وهو علاج مهم ضد إصابات *Legionella pneumophila*.

يمتلك مضاد Clarithromycin أهمية طبية جيدة وهو فعال ضد بكتريا *H.infleunzae* وضد الكلاميديا و *Borrelia* و *Legionella* .

يكون مضاد Azithromycin أقل فعاليه من الارثرومايسين ضد بكتريا *Streptococcus* و *S.aureus* إلا أنه فعال ضد الإصابات التنفسية الناجمة عن بكتريا *Moraxella catarrhalis* و *H.infleunzae* وفعال ضد بكتريا السيلان والكلاميديا.

6-3 مضادات Polypeptides

تتضمن مضادات Bacitracin و Polymyxins و Capremycin و Viomycin.

يكون مضاد Bacitracin فعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام وغير فعال ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام (عدا الكروية منها) ، أما مضاد Polymyxin فيكون فعالا ضد أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام ومن ضمنها *Serratia marcescens* و *Ps.aeruginosa* وأنواع بكتريا *Proteus*.

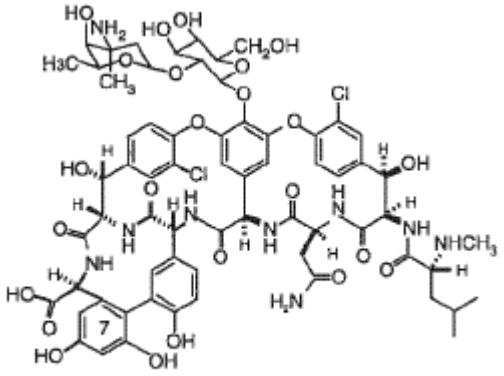
مضادات Viomycin و Capreomycin فعاله ضد بكتريا السل *M.tuberculosis* وتستعمل من ضمن علاجات الخط الثاني. يعطى مضاد الباستراسين في الاستعمال الخارجي بسبب سميته العالية.

الفعالية ضد البكتيرية لمضادات Polymyxins (A الى E) متشابهه وتكون جميع هذه المضادات سامة ، يدعى مضاد Polymyxin E بـ Colistin.

7-3 مضادات Glycopeptides و Lipoglycopeptides

تعد مضادات Vancomycin و Ristocetin من مضادات **Glycopeptides** المهمة :

يعزل مضاد Vancomycin من *Streptomyces orientalis* ، له تركيب معقد (Tricyclic glycopeptides) ، أستعمل المضاد في العلاج منذ سنة 1950 وله تأثيرات سامة وقد تم تنقيته ليصبح أقل سمية.



شكل 10 : مضاد الفانكومايسين.

يكون هذا المضاد فعال ضد معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام ومن ضمنها *S.aureus* المقاومة لمضاد المثيسلين وبكتريا *Enterococcus faecalis* و *S.epidermides* و *Clostridium difficile* والبكتريا السالبة لصبغة كرام الكروية. أما البكتريا السالبة لصبغة كرام العصوية وبكتريا السل والفطريات فتكون مقاومة له. تعد بكتريا *Enterococcus* المقاومة للفانكومايسين مشكلة طبية في المستشفيات . يكون مضاد الفانكومايسين قاتل للبكتريا الحساسة له بتراكيز قريبة من MIC وهو يثبط بناء الببتيدوكلايكان في جدار البكتريا. يعطى حقناً بالوريد لعلاج الإصابات التي لا تعالج بالمضادات الأخرى، ويعطى بالفم لعلاج ألتهاب الغشاء الكاذب (Pseudomembranous Colitis) المرتبط بأخذ مضادات مثل كلندامايسين ولنكومايسين.

مضاد Ristocetin يشبه مضاد الفانكومايسين من حيث التركيب وميكانيكية العمل ، له تاثيرات سميه عاليه وبذلك لا يستعمل في العلاج.

تعد مضادات Teicoplanin و Telavancin و Ramoplanin و Dalbovancin و Oritavancin من مضادات **Lipoglycopeptides** المهمة :

يكون مضاد Telavancin مشتق نصف مصنع من الفانكومايسين يضاف له سلسله جانبية محبه للدهون (decylaminoethyl) وسلسلة جانبية محبه للماء . مضاد

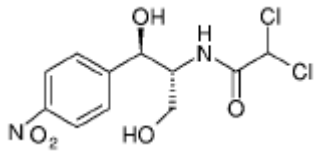
Teicoplanin ذو تركيب معقد يشبه الفانكومايسين بطيف الفعالية وميكانيكية عمله، ويختلف عنه بوجود سلسلة طويلة من الأحماض الدهنية . يكون أقل فعالية ضد بعض سلالات بكتريا *Staphylococcus* السالبة لفحص Co- agulase ، و أكثر كفاءة من الفانكومايسين ضد بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام .

8-3 مضادات بكتيرية متنوعة (Miscellaneous Antibiotics)

هناك العديد من المضادات التي لا يمكن وضعها تحت أي مجموعة من المجاميع التي مر ذكرها، ومن هذه المضادات :

مضاد Chloramphenicol

أكتشف هذا المضاد من قبل Ehrlich سنة 1947 وهو ينتج من بكتريا *Streptomyces venzuelae* ويمتلك طيف واسع وهو مثبط للبكتريا ، له فعالية ضد *Rickettsia* وبعض الفايروسات وفعال ضد بكتريا *S.aureus* و *Streptococcus* وبكتريا الخناق وبكتريا التايفوئيد *Salmonella* وبكتريا السيلان وبكتريا *E.coli* . لهذا المضاد سمية عالية فهو يسبب فقر دم أنحلالي (Hemolytic anemia) ومتلازمة الطفل الرمادي (Gray baby syndrome) ولا يفضل إعطاءه في الإصابات البسيطة عندما يوجد مضاد بديل . ذو طعم مر لذا يعطى كـ Palmitate لتحسين الطعم وعند دخوله القناة المعوية المعدية يتحلل الى كلورمفنكول. تقاومه بعض البكتريا عن طريق أنتاج أنزيم Chloramphenicol acetyltransferase.



شكل 11 : مضاد الكلورمفنيكول.

مضاد **Fusidic acid** : فعال ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام خاصة *Staphylococcus* المقاومة لبقية المضادات، أما بكتريا *Streptococcus* فتكون مقاومة له نوعاً ما.

Clindamycin و **Lincomycin** :

ينـــتج مضـــاد Lincomycin (مـــن مضـــادات Lincosamides) مـــن بكتريـــا *Streptomyces lincolnensis* وهو فعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام الكروية ما عدا *Enterococcus faecalis* وهو علاج أمثل لألتهابات اللوزتين الناتج عن بكتريا *Streptococcus pyogenes* ، كذلك يعطى بعد قلع السن لاحتمال تلوث الجروح ببكتريا *Streptococus viridans* التي قد تسبب ألتهاب شغاف القلب.

تكون البكتريا السالبة لصبغة كرام الكروية أقل حساسية له أما البكتريا المعوية فتكون مقاومة له. هناك مقاومة مشتركة لمضادي اللنكومايسين و الارثرومايسين عند بكتريا *Staphylococcus* لتشابه آلية العمل لكن هناك بعض البكتريا المقاومة للارثرومايسين يمكن أن تكون حساسة للّنكومايسين.

يعد **مضاد Clindamycin** أحد مشتقات اللنكومايسين و يتكون من 7-chloro-7-deoxy lincomycin hydrochloride يعرف تجارياً بـ Dalacin. يشبه اللنكومايسين بالفعالية وآلية العمل. يستخدم حقناً ضد البكتريا اللاهوائية *Bacteroides*، وبشكل حبوب لعلاج ألتهاب اللوزتين وغسول (Lotion) لعلاج حب الشباب (Acne). يؤثر على الفلورا الطبيعية مما يسبب Antibiotic associated colitis .

Mupirocin (Pseudomonic a- A) :

ينتج من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* ، له فعالية ضد بكتريا *Staphylococcus* ومعظم *Streptococcus* بينما تكون بكتريا *Enterococcus faecalis* والبكتريا السالبة لصبغة كرام العصوية مقاومة له.

يعمل على تثبيط أنزيم Isoleucyl tRNA Synthetase وبالتالي يثبط صنع البروتين.

هناك مقاومة متواسطة ببلازميد أنتقالي في بعض العزلات المرضية التابعة لبكتريا *S.aureus* تجاه مضاد Mupirocin ناتجة عن أنتاج أنزيمات Isoleucyl tRNA Synthetases مقاومة مشفرة بجين *ileS2* .

يعطى هذا المضاد لتقليل أستيطان (Colonization) بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين عند الحاملين لها بالأنف والجلد.

3-9 المضادات البكتيرية المصنعة

3-9-1 Sulphonomides:

أكتشفت من قبل Domak سنة 1935 عند أكتشاف مركب Prontosil الذي يتحلل الى مركبين احدهما سام لايمتلك فعالية ضد البكتريا هو Triaminobenzene ومركب آخر غير سام ذو فعالية ضد البكتريا هو Sulphanilamide.

من البكتريا المقاومة لمركب Sulphonoamide بكتريا *Enterococcus faecalis* و *Ps.aeruginosa* و *Proteus* الموجبة للأندول و *Klebsiella*.

أما البكتريا الحساسة له مثل *Pneumococcus* و

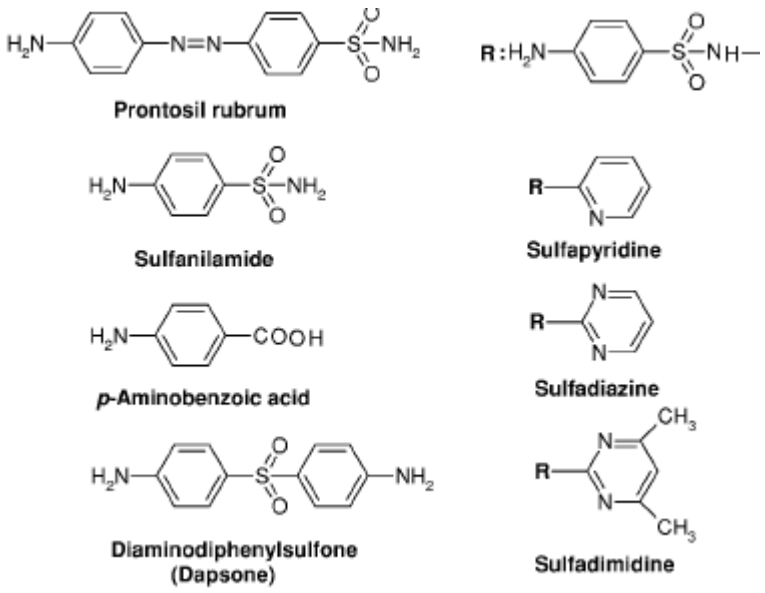
β-haemolytic Streptococcus و *E.coli* و *Proteus mirabilis* .

أما بكتريا *S.aureus* و Gonococcus و *Haemophilus influnzae* فتكون مختلفة في أستجابتها لهذه المضادات.

تمتص مركبات Sulphadiazine و Sulphadiamidine بسرعة وتصل مجرى الدم بينما يكون مركب Succinyl Sulphathiazine ضعيف الامتصاص ويطرح بدون تغيير مع الخروج، يستعمل بشكل أساسي لتعقيم القناة الهضمية قبل اجراء العمليات الجراحية وفي حالات الاسهال الشديد.

يستعمل مركب Sulfasalazine لعلاج ألتهابات القولون التقرحي و مرض Crohn ، تعمل بكتريا الأمعاء على تحطيم هذا المركب الى Sulfonamide sulfapyridine و Mesalamine المضاد للألتهابات وهو يثبط بناء أشارات الأنجذاب الكيمياوي لخلايا الدم البيضاء الحبيبية .

تستعمل مركبات السلفا لعلاج التهابات المجاري البولية المتسبب عن بكتريا *E.coli* و *Proteus mirabilis* وعلاج السحايا المتسبب عن *Neisseria meningitides* (هناك حالياً مشكلة في مقاومة هذه البكتريا لمركبات السلفا) ، وتستعمل كذلك في علاج إصابات العيون السطحية.



شكل 12 : بعض الأمثلة على مركبات السلفونومايد.

3-9-2 مشتقات Diamino pyrimidine

عرفت هذه المركبات منذ سنة 1948 لها فعل antifolate وتكون فعالة ضد الخلايا السرطانية [مركب methotrexate فعال ضد السرطان] والبروتوزوا [مركب pyrimethamine فعال ضد الملاريا] والبكتريا [Trimethoprim فعال ضد البكتريا]

يرتبط مضاد Trimethoprime بأنزيم [DHFR] Dihydrofolate reductase البكتيري الذي يحول حامض الفوليك الى (THF)Tetra hydrofolate فيكون فعال ضد البكتريا لأنه يؤثر على صنع القواعد النيتروجينية ، ويعد مضاد Trimethoprime مثبطا للبكتريا .

من المشتقات الحديثة مضاد Tetroxoprim واسع الطيف فعال ضد البكتريا وقد تنشأ مقاومة ضده بتغيير موقع الهدف.

3-9-3 مركب Co-trimoxazole :

خليط من مركب Sulphamethoxazole (خمسة أجزاء) و Trimethoprime (جزء واحد) وأسماءه التجارية Bacterim و Methoprim وهو يعد قاتل للبكتريا.

يستعمل لعلاج إصابات ذات الرئة المتسبب عن *Pneumocystis carinii* عند المرضى الذين يستعملون أدوية مثبطة للمناعة والذين يعانون من الإيدز، ولعلاج

التهابات المجاري البولية والبروستات المتسبب عن البكتريا السالبة لصبغة كرام والالتهابات التنفسية المتسببة عن بكتريا *Heamophilus influnzae* و *Streptococcus pneumoniae* والالتهابات المعدية المعوية.

من التأثيرات الجانبية لهذه المضادات اضطرابات هضمية مثل الغثيان والتقيؤ والتهاب الفم واللسان ولها تأثيرات سامة للنفرون ويسبب فقر دم انحلالي وتفاعلات فرط الحساسية.

3-9-4 مركب Dapsone:

هو عبارة عن diamino diphenyl sulphone يستعمل لعلاج الجذام (Leprosy) ويوصى بخلطه مع الريفامبسين و Clofazimine ، كذلك يستعمل للوقاية من الملاريا و Toxoplasmosis و Actinomycosis ، يعطى فمويا وهو يؤثر على خلايا الدم الحمراء .

3-9-5 مضادات Antitubercular:

تعد من المركبات المهمة في علاج مرض السل أضافة لمضادات الستربتومايسين والريفامبسين . من أمثلتها مضاد P-aminosalicylic acid (PAS) وهو مهم لمنع تطور المقاومة ضد الستربتومايسين.

يعتمد علاج مرض السل على خلط مضادات ستربتومايسين و PAS وisoniazed وهناك أدوية مهمة أخرى لعلاجه مثل ethambutol و Pyrazinamide.

يعد مركب isoniazed مهم ضد بكتريا السل ولا يستعمل ضد غيرها وهو يعطى فموياً، ولم تسجل حالات مقاومة مشتركة ضده وضد الستربتومايسين والريفامبسين. وعند حصول مقاومة ضد هذه المركبات المهمة ينصح بأستعمال مركبات أخرى مثل Capreomycinو Cycloserine و Azithromycin و Clarithromycin و Ofloxacin و Ciprofloxacin و Parthionamide و Pyrazianamide و Ethionamide . عزلت سلالات من بكتريا السل تحمل مقاومة متعددة للمضادات Multi drug-resistance *M .tuberculosis* (MDRTB).

3-9-6 مركبات Nitrofurans

تضم مئات من المركبات المصنعة ، لكن القليل منها يستعمل طبياً ومنها مركب Furazolidine الفعال ضد أغلب بكتريا العائلة المعوية، وهي تستخدم لعلاج الاسهال والالتهابات المعوية المعدية البكتيرية.

*Nitrofurazone يستعمل كمرهم خارجي لعلاج الحروق والجروح وبعض إصابات الأذن. يعتقد أن مركبات Nitrofurans مطفرة (Mutagenic).

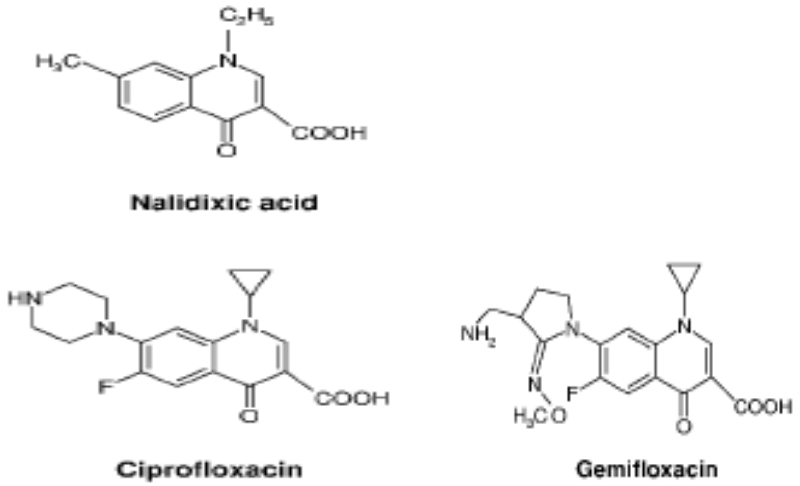
3-9-7 مضادات Quinolones

تضم هذه المجموعة أكثر من 10000 مضاد، يعد مضاد Nalidixic acid من أوائل هذه المضادات ، وهو من مضادات الجيل الأول أستعمل كعلاج مهم طبياً ضد التهابات المجاري البولية وهو من الكوينولونات غير المفلورة ويكون ذو تأثير فعال ضد معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام المسببه لالتهابات المجاري البولية الا أن البكتريا الموجبة لصبغة كرام تكون مقاومة له. يسبب غثيان وتقيؤ وألم بطني وحمى وتحسس ضوئي (Phototoxicity).

تكون مشتقات الجيل الثاني أكثر فعالية وأوسع طيفاً وتدعى Fluoro quinolones مثل Norfloxacin و Ciprofloxacin وتكون فعالة ضد بكتريا العائلة المعوية و *Pseudomonas aeruginosa* وضد *Staphylococcus* ولكنها غير فعاله ضد *Streptococcus* . يكون مضاد نورفلوكساسين واسع الطيف ذو تركيز عالي في الإدرار ويعطى بالفم وهو مهم في علاج التهابات المجاري البولية والبروستات ولا يستعمل في الإصابات الجهازية.

يستعمل مضاد Ciprofloxacin في علاج إصابات بكتريا *Pseudomonas* المرتبطة بالتليف الكيسي (Cystic fibrosis) وعلاج البكتريا المقاومة لبقية المضادات خلطاً مع مضادات البيتالاكتام والأمينوكلايكوساید، ويعطى لعلاج الدزنتري المتسبب عن بكتريا *Shigella* ومرض التايفوئيد بدلاً عن الكلورامفنيكول والتهاب الأذن الوسطى ومرض السيلان.

يكون مضاد Ofloxacin مشابه لمضاد نورفلوكساسين ، يستعمل لعلاج التهاب البروستات المتسبب عن بكتريا *E.coli* والأمراض المنتقلة جنسياً خاصة السيلان ولا يعطى ضد مرض السفلس.ويكون مضاد Gemifloxacin فعالا ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام.



شكل 13 : بعض مضادات الكوينولونات.

تشمل مضادات الجيل الثالث مضادات Lomefloxacin و Sparfloxacin و Temafloxacin.

تكون مضادات Enoxacin و Lomefloxacin مهمه في علاج التهابات المجاري البولية والتنفسية الناتجة عن بكتريا *Moraxella catarrhalis* و *Haemophilus influnzae* ولا يعطى مضاد Lomefloxacin ضد تسمم الدم الناتج عن بكتريا *Pseudomonas*.

يسبب مضاد Temofloxacin فقر الدم ويعد Nephrotoxic . يعطى مضاد Trovafloxacin مرة واحدة باليوم اذ أن نصف عمر (Half Life) المضاد يصل الى حوالي 10 ساعات. يكون هذا المضاد واسع الطيف لكن له تأثيرات سمية خاصة على الكبد فيكون استعماله مقتصراً على الإصابات التي تكون مهددة لحياة المرضى مثل ذات الرئة وإصابات الحوض وإصابات أخرى لكن يجب أن لا تتجاوز مدة العلاج (14) يوم وأن يكون المريض داخل المستشفى تحت العناية الطبية طويلة الأمد.

يجب أن لا تعطى مضادات الكوينولون للنساء الحوامل أو النساء المرضعات والأشخاص الأقل من 18 سنة لأنه يسبب حدوث تآكل غضروفي مفصلي (Arthropathy).

3-9-8 مركبات Imidazole

تكون بعض هذه المركبات فعاله ضد البكتريا والابتدائيات مثل Metronidazole وبعضها يكون فعالا ضد الفطريات مثل Clotrimazole و Miconazole و Ketoconazole و Econazole وبعضها فعال ضد الديدان مثل Mebenadazole.

الفصل الثاني

مقدمة عن المادة الوراثية في الخلية البكتيرية

أولا : التركيب الكيميائي للأحماض النووية

الأحماض النووية جزيئات حيويه كبيره مكونة من وحدات متكرره تدعى النيوكليوتيدات ،تتألف النيوكليوتيده الواحده من مجموعة فوسفات واحده وسكر وقاعده نايتروجينيه.

يكون السكر المساهم في تركيب النيوكليوتيد في DNA هو السكر الخماسي D-2-deoxy ribose في حين يكون السكر الخماسي الموجود في RNA هو D-ribose وهذا يضفي الثباتيه على جزيئه DNA اكثر من RNA ، أذ ان نقصان OH على الذره الثانيه للكاربون واستبدالها ب H- في جزيئة DNA يجعلها أكثر ثباتيه لأن مجموعة الهيدروكسيل اكثر فعاليه من الهيدروجين ، وهذا يكون ضروريا في DNA كماده وراثيه والتي يجب أن تكون ثابته لغرض توارثها في الأبناء والاحفاد.

يحوي سكر D-ribose في RNA على مجموعه OH في ذرات الكاربون رقم 1 و 2 و3 و4 و5 بينما يكون سكر D-2-deoxy ribose في DNA فاقدا لذره الأوكسجين عند الموقع رقم 2 من ذرات الكاربون

B
(Ribose)

A
(Deoxy-Ribose)

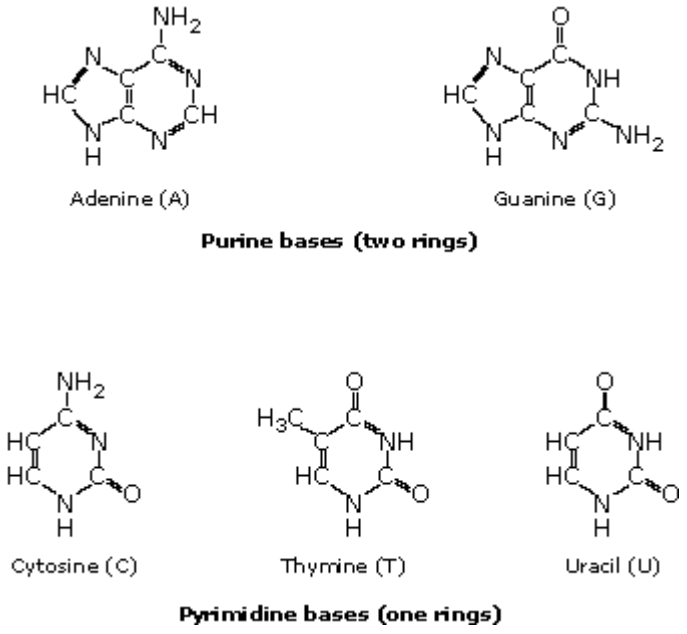
شكل 14: السكر الخماسي الذي يدخل في تركيب الأحماض النووية (A- السكر الخماسي الرايبوز منقوص الأوكسجين ، B- السكر الخماسي الرايبوز).

أضافة الى الفوسفات والسكر التي تكون عامه في الحوامض النوويه توجد القواعد النتروجينيه وهي البريميدينات (Pyrimidines) والبيورينات (Purines).

تتألف البيورينات من حلقه بريميدين مرتبطه مع حلقه اميدازول خماسيه في الموقعين 4 و 5 وتتمثل البيورينات بقواعد Guanine (G) و Adenine (A) ،

أما البريميدينات فتتمثل بقواعد Cytosine (C) و Thymine (T) و Uracil (U) .

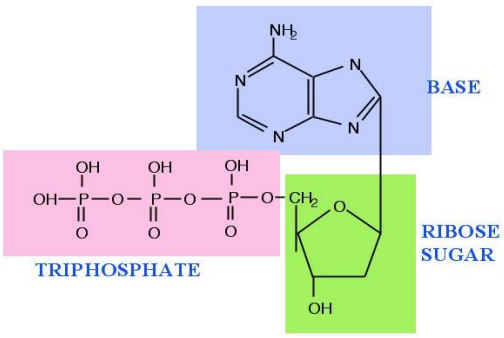
تتالف جزيئة DNA من القواعد النايتروجينيه A , G, C ,T ولاتحتوي على القاعده U (يوراسيل) ، بينما تتألف جزيئة RNA من القواعد النايتروجينيه A , G , C , U ولا تحتوي على القاعده T (ثايمين). وتوجد هناك قواعد نتروجينيه محوره في tRNA وبعض RNA في بعض العاثيات.



شكل 15 : القواعد النايتروجينية الموجودة في الأحماض النووية.

عند أتحاد السكر مع أحدى القواعد النايتروجينيه يتكون تركيب يدعى النيوكليوسيد (Nucleoside) وهو نوعين حسب السكر الداخل في تكوينه ، فعند أحتوائه على الرايبوز يدعى رايبونيكليوسيد ، بينما يدعى ديوكسي رايبونيكليوسيد عندما يحتوي على الديوكسي رايبوز. يرتبط السكر بالقاعده بآصره كلايكوسيديه بين ذرة الكاربون رقم (1) في السكر مع ذرة النايتروجين رقم(9) في البيورينات، وبين ذره الكاربون رقم (1) في السكر مع ذره النايتروجين رقم (3) في البريميدينات.

عند أتحاد النيوكليوسيد مع مجموعة الفوسفات تتكون النيوكليوتيده . ترتبط مجموعة الفوسفات مع السكر الموجود في النيوكلوسيده في ذرة الكاربون رقم (3) او (5) للسكر وهذا الارتباط في الذره (3) او (5) هو الذي يحدد لاحقا قطب شريط الدنا 3^- او 5^-.



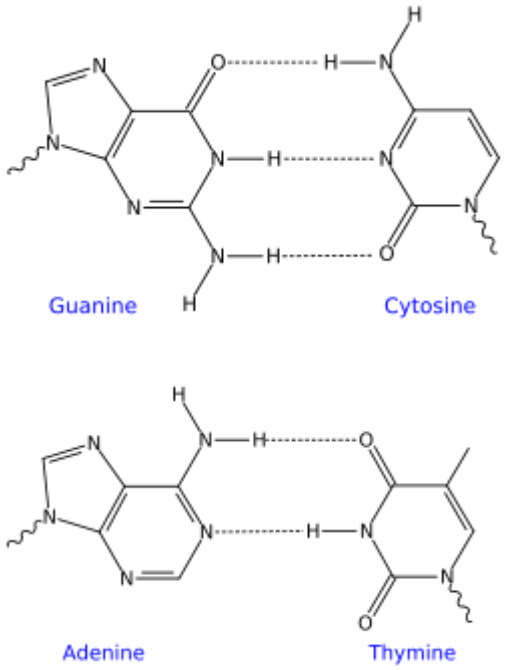
شكل 16 : تركيب النيوكليوتيده الواحدة (قاعدة نايتروجينية و سكر رايبوز و مجموعة فوسفات).

ترتبط النيوكليوتيدات فيما بينها بأواصر فوسفاتيه ثنائية الاستر(Phosphodiester bonds) بين ذرة الكاربون رقم 3 لسكر النيوكليوتيده الاولى مع ذرة الكاربون رقم 5 لسكر النيوكليوتيده الثانيه اي تربط بين 3-OH لنيوكليوتيده مع Po_4 -5 لنيكليوتيده اخرى وهكذا .....

هذا الارتباط غير المتناظر هو الذي يعطي القطبيه لتوالي النيوكليوتيدات ، وبذلك ترتبط ألاف النيوكليوتيدات مع بعضها مكونه شريط مفرد للحامض النووي .

بالنسبه للحامض النووي RNA فهو عباره عن شريط مفرد ما عدا في حالة بعض الفايروسات وفي بعض انواع البلازميدات مثل بلازميد الجزيئه القاتله (يكون مزدوج الشريط) . لا يوجد شئ يمنع RNA (من حيث التركيب) من الازدواج لتكوين جزيئه مزدوجة الشريط سواء بأرتباط شريط RNA مع اخر او مع DNA او حتى في نفس الشريط يمكن ان تتكون مناطق مزدوجه كما في حالة tRNA و rRNA ففي كلاهما ممكن ان تتكون مناطق مزدوجه .

أما جزيئة DNA فتكون عباره عن شريطين من متعدد النيوكليوتيدات (Polynucleotides) ، يرتبط أحدهما مع الاخر عن طريق أصره هيدروجينيه تربط القواعد النتروجينيه للشريط الاول مع القواعد النتروجينيه للشريط الثاني وتكون هذه الاصره مزدوجه بين قواعد الأدنين والثايمين وثلاثيه بين قواعد الكوانين والسايتوسين ويكون احد الشريطين مكملا للأخر.



شكل 17 : طريقة أرتباط القواعد النايتروجينية مع بعضها بوساطة الأصرة الهيدروجينية.

يوجد DNA في حالات قليله بشكل ثلاثي الأشرطه (Triplex DNA) ، يرتبط الشريط الثالث مع الاشرطه الثنائيه بواسطة زوج محدد من القواعد النتروجينيه ويمكن تحضير او صنع بعض جزيئات DNA ثلاثي الاشرطه في المختبر لأغراض معينه مثل الكشف عن تتابعات محدده او أعاقة بعض وظائف الجينات .

الحلزون المزدوج (Double Helix):

قدم Watson و Crick في 25 نيسان سنه 1953 ولأول مره نموذجا للبنيه الحلزونيه المزدوجه لجزيئة DNA . وجد هذان العالمان أن جزيئة DNA تتكون من سلسلتين متكاملتين تلتفان حول بعضهما ليكونا حلزونا مزدوجا منتظما تشكل فيه وحدات السكر ومجموعات الفوسفات الجزء الخارجي للحلزون في حين تبرز القواعد النتروجينيه الى الداخل من العمود الفقري .

تكون السلسلتين في جزيئة DNA مكملتان لبعضهما البعض ، فعند معرفتنا لتسلسل القواعد النتروجينيه لاحدى السلسلتين يمكننا معرفة تسلسل القواعد في السلسله الاخرى . مثال: لو كان تسلسل القواعد في السلسله الاولى **ATGCTT** فأن التسلسل في السلسله الثانيه يكون **TACGAA** .
وجد ان نسبة T+A اعلى من نسبه C+G في الحيوانات والنباتات الراقيه ، في حين لوحظت اختلافات كبيره في هذه النسب في البكتريا والفايروسات والنباتات الواطئه ، وهذه النسبه بين القواعد تكون ذات اهميه كبيره في التشخيص أذ تكون النسبه متشابهه في الكائنات القريبه تصنيفيا من بعضها .
تلتف سلسلتي DNA حول بعضهما البعض وتتكون الدوره (اللفه) الواحده من عشر ازواج قواعد نتروجينيه ويكون ارتفاع الدوره الواحده 34 A° اما ارتفاع زوج القاعده الواحده فيكون 3.4 A° ويكون قطر الحلزون 20A° .

ثانيا : جينوم الخلايا بدائية النواة :

يتكون جينوم خلايا بدائية النواة من كروموسوم حلقي واحد يحوي على حوالي 580–4600 كيلو زوج قاعده وتتراوح أوزانها الجزيئية من 0.4×10^9 - 8.6×10^9 دالتون . يكون الكروموسوم في بعض هذه الاحياء صغير جدا كما في بكتريا *Mycoplasma* والأحياء المجهرية البحرية ، وقد يكون كبير في الأحياء التي تمتلك نوعا من التمايز والتخصص مثل *Myxococcus* .

تحتوي بعض البكتريا على كروموسوم غير حلقي كما في البكتريا الموجبه لصبغه كرام مثل *Borrelia* وبعض انواع *Streptomyces* ، وتحوي بعض الأجناس على كروموسوم حلقي وأخرغير حلقي كما في بكتريا *Agrobacterium tumifaciens* .

في بكتريا *E.coli* (التي يعد كروموسومها النموذج الامثل للدراسه) يشكل الكروموسوم حوالي 2–3 % من وزن الخليه الجاف ويصل حجمه الى 4500 كيلو زوج قاعده وبوزن 3×10^9 دالتون وهو كافي للتشفير لعدة الآف من السلاسل الببتيديه ، ويصل طوله الى 1.35 مليمتر فيكون بذلك أطول من الخليه عدة مئات من المرات لذا يلتف مع بروتينات شبيهة الهستونات (Histones like proteins) القاعديه

مكوّنا تركيب Nucleoid الذي يمثل الماده النوويه للخليه . ويكون الكروموسوم مفرد مزدوج الشريط دائري (حلقي) مغلق ، ويوجد هناك ما يعرف بالمقاطعات (Domains) : وهي قطعه للحامض النووي DNA مكونه من الحلزون فائق اللف (Super coiled) بشريطيه ومحدده بمكانين مقيدين لدوران الحلزون ويقدر عدد المقاطعات في DNA بكتريا *E.coli* ب 100 مقاطعه كل واحده منها تسلك سلوكا مستقلا عن غيرها.

تحتوي جينومات بدائية النواة على عدد كبير من التواليات القصيره (SSR) Short Sequence Repeats توجد خارج المناطق المشفره للجينات وتتكون هذه التواليات من مكررات قواعد A او G او C او T وقد تكون هذه المكررات متجانسه اي تتكون من القاعده النتروجينيه نفسها او تكون متباينه ، كما قد تكون قصيره او طويله (قصيره 1–6 نيوكليوتيدات) (الطويله تصل الى 15 او 200 نيوكليوتيد) تشترك في تنظيم فعالية البروتينات ، ويمكن ان تشارك في تحديد تتابع الحوامض الامينيه في البروتينات وهي تساعد في التطبع البيئي للاحياء نظرا لحصول التغيرات فيها وهي يمكن ان تساهم في عمليات تطور الاحياء . درست هذه التواليات في بعض البكتريا المرضيه لعلاقتها بالمقاومه للأدويه كما يمكن استعمالها في الدراسات الوبائيه ومن هذه البكتريا :

Staphylococcus aureus : تحوي تواليات في الجينات المسؤوله عن تخليق البروتينات المرتبطه بالأغشيه وتكون متجاوره ولها القابليه على الارتباط بعدد من الجزيئات الكبيره الموجوده على سطوح خلايا المضيف مثل الكولاجين والايلاستين وغيرها.

Mycobacterium tuberculosis : يحوي جينوم هذه البكتريا على عدد من التواليات المتكرره المنتشره واكثر هذه التواليات هي Insertion sequences (I S) .

Streptococcus spp. :تحوي جين(*emm*) الذي يحوي تواليات قصيره وهذا الجين يشفر لبروتين M الذي يعد احد عوامل الضراوه يساعد الخلايا على مقاومة البلعمه.

وفي نوع *S. pneumoniae* توجد منطقه تواليات Box التي تشترك في ظاهرة التأهل (Competence) المهمه لأستلام DNA بطريقة التحول (Transformation).

Neisseriae spp. : تحتوي تواليات (26 نوع) بنسخ متعدده سميت N .grep تؤدي الى تغاير الطور حيث تؤثر في L.P.S في بكتريا السيلان يساعدها على الهروب من الجهاز المناعي .

ثالثا تضاعف DNA وتعبير الجين

1- تضاعف الحامض النووي DNA

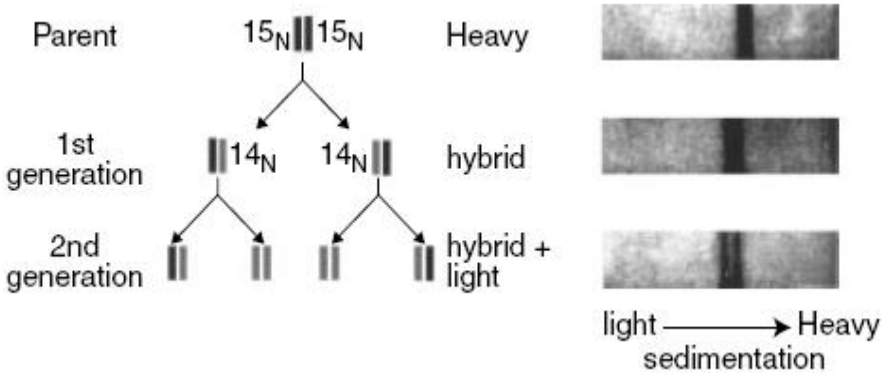
يقوم DNA بوظيفة خزن المعلومات الوراثية الكاملة المطلوبة التي تخص بناء البروتين وحامض RNA في الخلية ، وهو الذي يقوم ببرمجة البناء الحيوي الخلوي ، ومن أجل أن تقوم جزيئات DNA بخزن ونقل المعلومات الوراثية بصورة أمينة لابد أن تكون لها القدرة على التضاعف (التكرار) بصورة دقيقة غير قابلة للخطأ وبشكل يؤمن حصول الأجيال الناتجة على نفس الكمية والنوعية من المعلومات الوراثية الموجودة في الآباء .

أقترح واتسون وكريك طريقة الاحتفاظ النصفي لتضاعف DNA (Semi conservative replication) والتي تعتمد على حقيقة تكامل الحلزون حسب قاعدة الازدواج القاعدي وتفترض أنفصال شريطا الحلزون عن بعضهما في بداية التضاعف ثم يعمل كل شريط كقالب لصنع شريط جديد وبالتالي يتم الحصول على جزيئتين من DNA كل واحدة تحوي شريط قديم وآخر جديد مكمل له.

أثبت مسلسن وستال (Meselson & Stahl) سنة 1958 بأستخدام طريقة الكثافة الترسيبية المتدرجة (Density gradient centrifugation) الطريقة الحقيقية التي يتضاعف بها DNA في البكتريا . تم أستخدام كلوريد السيزيوم الذي تتحرك أيوناته بالطرد المركزي فتتوزع الأيونات الكثيفة الى الأسفل والخفيفة الى أعلى الأنبوبة وبالتالي تنفصل الجزيئات مختلفة الكثافة عن بعضها وتتجمع الجزيئات المتشابهة على شكل طبقات على طول أنبوبة الجهاز وحسب الكثافة. أجريت التجربة على بكتريا *E.coli* بتنميتها على وسط غذائي يحوي كلوريد الأمونيوم ذات النايتروجين المشع N15 (وجوده في أي جزيئة يعطيها كثافة)، بعد التنمية بـ 14 جيل فأن النايتروجين N15 سيحل محل النايتروجين الخفيف N14 الموجود أصلا في DNA الخلايا (كثافة N15 أعلى من N14). بعد تعليم (وسم) الخلايا بواسطة N15 تنقل مرة أخرى الى وسط غذائي يحوي نايتروجين N14 لفترة ثم يتم سحب DNA من الخلايا ، وبعد أختبار DNA في هذه التجربة" لاحظ العالمان:

1- ظهور طبقة أسفل الأنبوبة عند أستعمال العينة التي أخذت قبل نقل الخلايا الى الوسط الزرعي الحاوي N14 مما يدل على أن جميع DNA في ذلك الوقت يحوي N15
2- بعد مرور زمن جيل واحد من النمو في الوسط الزرعي المحتوي N14 ظهرت طبقه واحده في موقع في منتصف المسافة بين طبقة N15 و N14 هذا يعني ان جميع DNA الخلايا مكون من جزيئة هجينة يحتوي نصفها على N15 ونصفها الاخر على N14

3- بعد مرور جيلين في الوسط نفسه ظهرت طبقتان الاولى تمثل DNA المتألف من N15 و N14 وطبقة اخرى في أعلى الانبوبة تمثل DNA المحتوي N14 . اي هناك نوعان من جزيئات DNA الاولى هجينة تحوي N15 / N14 و الثانية تحوي N14 .
أثبتت نتائج تجربة ميسلسن وستال ان تضاعف DNA البكتريا يتم حسب طريقة الاحتفاظ النصفي .
بعد ذلك وفي تجارب لاحقة تم أثبات ان كروموسومات كل الكائنات الحية تتضاعف بطريقة الاحتفاظ النصفي .



شكل 18: أستعمال طريقة الكثافة الترسيبية المتدرجة لدراسة تضاعف DNA .

أستطاع Kornberg سنة 1955 من عزل وتنقية أنزيم DNA Polymerase المسؤول عن صنع شريط DNA جديد أثناء عملية التضاعف من خلال أضافته للنيوكليوتيدات الجديدة الى الشريط النامي لجزيئة DNA وحسب الازدواج القاعدي اعتمادا على القواعد النايتروجينية الموجودة في الشريط القالب ، وبعد تنقية هذا الانزيم أصبح ممكنا صنع شريط DNA في انبوبة الاختبار و بالتالي فهم آلية التضاعف .

يحدث التضاعف في الخلايا الحية بعملية إنزيمية معقدة تشترك فيها العديد من العوامل المساعدة . تمرعملية تضاعف DNA في بدائية النواة (على سبيل المثال بكتريا *E.coli*) بثلاث مراحل هي بدء التضاعف والإستطالة والإستئصال والربط.

مرحلة بدء التضاعف

يبدأ تضاعف الكروموسوم الدائري المغلق لبكتريا *E.coli* من نقطة واحدة ثابتة هي نقطة أصل التضاعف أو منشأ التكرار (Origin of replication) حيث ينفصل شريطا الحلزون المزدوج من هذه النقطة بعد القطع بإنزيم Endonuclease يبدأ بعدها إنزيم التضاعف DNA Polymerase ببناء شريطين جديدين مكملة للشريطين الأبويين، وكلما أستطال الشريطين الجديدين أستمر انفصال الشريطين القديمين عن بعضهما البعض وتدعى منطقة انفصال الشريطين عن بعضهما بشوكة التضاعف (Replication fork) منطقة Y-shape.

يعمل أنزيم Helicase على فتح الشريطين الأبويين بتكسير الأصرة الهيدروجينية الرابطة بين القواعد النايتروجينية ، وبعد أبتعاد شريطا الحلزون عن بعضهما تقوم إنزيمات (SSBs) Single stranded binding proteins بمنع عودة الشريطين المفتوحة للارتباط ببعضهما.

توجد في حقيقية النواة أكثر من نقطة بدء تضاعف لكبر حجم الكروموسوم مقارنة بالبدائية.

مرحلة الأستطالة

يحصل أولاً أستنساخ قطعة قصيرة من RNA (Primer) بطول 60 زوج قاعدة ترتبط بشريط DNA (في منطقة محددة) يصنعها أنزيم Primase وهو من أنزيمات RNA polymerase تكون مكملة لتتابع معين في شريط القالب ولها نهاية 3-OH حرة يعمل أنزيم التضاعف عليها ،والذي لا يستطيع إضافة أي نيوكليوتيدة إلا بوجود نهاية 3 -OH حرة.

بعد توفر النهاية الحرة 3-OH يبدء إنزيم التضاعف DNA polymerase III بأضافة القواعد النايتروجينية حسب الازدواج القاعدي ويتم التضاعف على الشريطين بنفس الوقت بكلا الاتجاهين فيدعى التضاعف ثنائي الأتجاه (Bidirectional replication).

شكل 19: التضاعف ثنائي الأتجاه والذي يحصل على الشريطين بنفس الوقت بكلا الاتجاهين.

يكون التضاعف دائما بالاتجاه 5^- الى 3^- . المعروف أن DNA يكون عبارة عن شريطين متعاكسين بالاتجاه أحدهما الشريط العلوي القائد (Leading strand) بالأتجاه 3^- الى 5^- والشريط الثاني هو الشريط السفلي أو الخامل (lagging strand) بالأتجاه 5^- الى 3^- . بالنسبة للتضاعف على الشريط العلوي لاتوجد أية مشكلة أذ يحتاج primer واحد فقط ثم يعمل أنزيم التضاعف بشكل مستمر لأن لا توجد مشكلة باتجاه الشريط العلوي 3^- الى 5^- وأتجاه الشريط الجديد النامي 5^- الى 3^- أي نحصل بالنهاية على جزيئة DNA بشريطين متعاكسين . لكن المشكلة هي بالشريط السفلي الذي يكون أتجاهه 5^- الى 3^- و البناء هو باتجاه 5^- الى 3^- دائما .. النتيجة تكون جزيئة DNA بشريطين بنفس الاتجاه و هذا لا يمكن أصلا فلا توجد جزيئة DNA أشرطتها بنفس الاتجاة .

يحصل التضاعف على الشريط السفلي ببناء قطع قصيرة من DNA تدعى قطع اوكازاكي (Okazaki fragments) يرتبط بها أنزيم Primase لبناء Primer لكل قطعة فيقوم انزيم التضاعف بالبناء لمسافة و هكذا، فيكون البناء متقطع أي تضاعف غير مستمر.

تستمر البلمره و بناء الشريطين الجديدين أذ يعمل أنزيم التضاعف بسرعة عالية (900 زوج قاعدة بالثانية) ويستمر فتح الشريطين الابويين بواسطة انزيم Helicase الذي يقوم بتكسير الآصرة الهيدروجينية بين قواعدهما النايتروجينية . يدعى المعقد المتكون من انزيم التضاعف و البروتينات الفاتحة لجزيئة DNA بمعقد replisoma .

الاستئصال و الربط

عند وصول البناء الى نقطة الانتهاء (Terminus) وهي النقطة المقابلة لنقطة أصل التضاعف يتم إزالة Primer بأنزيم DNA Polymerase 1 (في حقيقية النواة يزال Primer بواسطة أنزيم ribonuclease ثم تصنع قطعة DNA لملأ الفراغات الناتجة من أزالة البادئ ، يتم بعدها ربط قطع اوكازاكي بأنزيم DNA Ligase) .

ان من أهم الانزيمات الداخلة في تضاعف DNA :-

1) Topoisomerase والذي يكون بأنواع :

يقوم أنزيم Topoisomerase I بمنع التفاف شريطي DNA بعد فتحهما بكسر الأصرة phosphodiester bond في بداية التضاعف .

اما Topoisomerase II و الذي يدعى أيضا DNA Gyrase فهو يعمل على أعادة شريطي DNA للالتفاف مرة ثانية بعد التضاعف .

2) Helicase : يعمل على فتح شريطي DNA من خلال كسر الاصرة الهيدروجينية الرابطة لشريطي DNA .

3) SSBs تعمل على منع أرتباط الشريطين المفتوحة وتدعى أيضا ببروتينات Helix – destabilizing Proteins

4) DNA Polymerase :– يعمل على بناء الشريط الجديد بأضافة النيوكليوتيدات الى النهاية الحرة 3^{-}-OH

أنواع أنزيم DNA Polymerase في بدائية النواة :

DNA Polymerase 1 : يبلمر بالاتجاه 5^{-} الى 3^{-} و له فعالية محلله بالاتجاة المعاكس 3^{-} الى 5^{-} أذ يزيل البادئ ، و يملئ الفراغ المتكون عن ذلك .

DNA Polymerase II : يبلمر بالأتجاه 5^{-} الى 3^{-} و يعمل تصحيح في الأتجاه 3^{-} عند حصل خطأ.

DNA Polymerase III : يعد اهم انزيمات البلمرة ، يبلمر بالاتجاه 5^{-} الى 3^{-} و يعمل على تصحيح الخطأ ، كذلك له فعالية محلله بالاتجاه المعاكس يشبه بذلك ألأنزيم رقم 1.

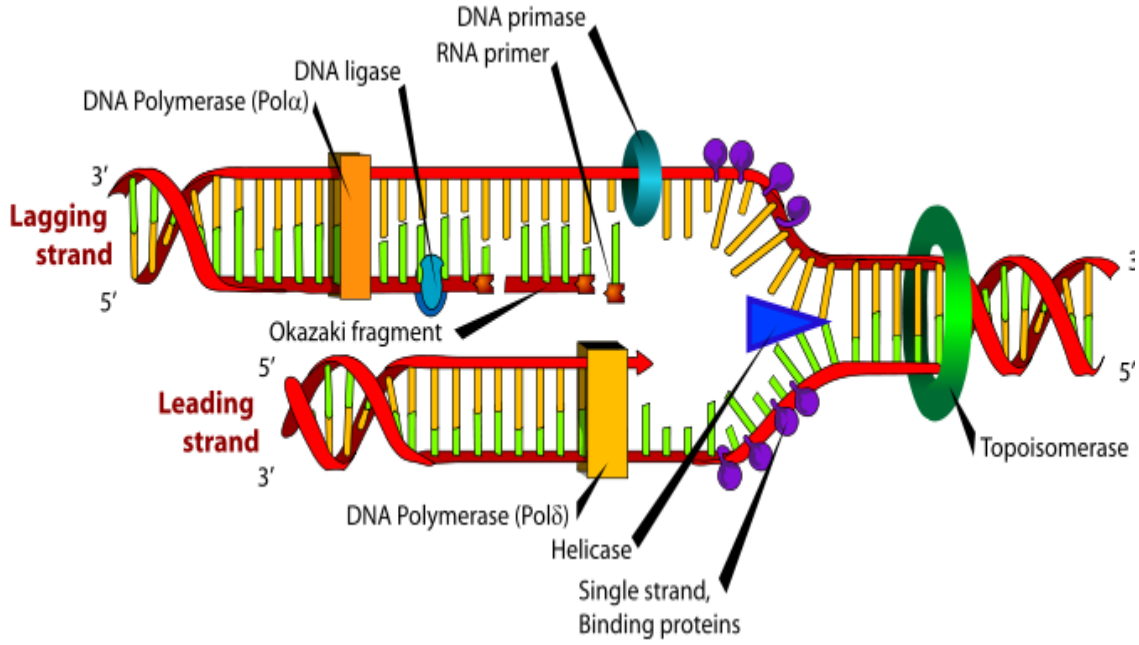
أنواع أنزيم DNA Polymerase **في حقيقة النواة :**

DNA polymerase α : يبلمر DNA النواة وهو يكافئ DNA Polymerase 1 في البدائية.

DNA polymerase ß :- له قابلية الاصلاح (اصلاح الخطأ في البلمرة).

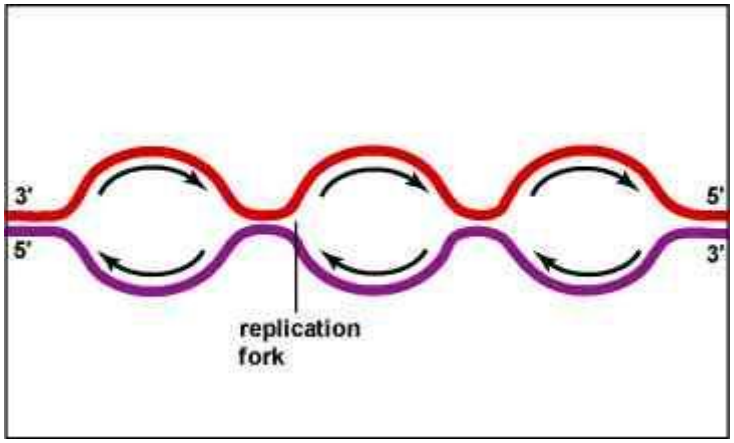
DNA polymerase ¥ :- يبلمر DNA المايتوكوندريا.

DNA polymerase £ :- يكافئ أنزيم DNA P. III في البدائية حيث يبلمر بأتجاه 5^- الى 3^- ويحلل باتجاه 3^- الى 5^- .



شكل 20 : أهم الأنزيمات الداخلة في التضاعف .

يكون التضاعف في حقيقية النواة بنفس المبدأ لكن يوجد هناك أكثر من نقطة بدأ تضاعف بسبب كبر حجم الكروموسوم ، أذ يوجد هناك الكثير من المتضاعفات (replicons)، ويبدأ التضاعف باتجاهين متعاكسين من 5^- الى 3^- بسرعة تقدر بـ 2-6 مايكرومتر/ دقيقة سرعة المنطقة المنفرجة وهذا أقل بـ 40 مرة عن سرعة التضاعف ببكتريا *E.coli* وينتهي التضاعف عند تلاقي المتضاعفات.



شكل 21 : المتضاعفات(replicon) في كروموسوم حقيقية النواة.

تستغرق عملية تضاعف الكروموسوم في بكتريا *E.coli* 40 دقيقة ، و يبدأ التحضير لهذه العملية قبل 20 دقيقة من انقسام الخلية ، و يعتمد ذلك على ظروف التنمية و في افضل الظروف يمكن ان تنقسم الخلية كل 20 دقيقة ، فكيف تستطيع الخلايا من الانقسام اسرع من تضاعف الكروموسوم ثم تحصل كل خلية جديدة على نسخة من الكروموسوم ؟ يعتمد ذلك على وقت بدأ التضاعف فالبدأ لا يتحفز بأنقسام الخلية فقط انما بتغير حجم الخلية .

هناك علاقة بين مجمل تضاعف الكروموسوم و أنقسام الخلية و السيطرة على بداية التضاعف و هذة العلاقة معقدة جدا و تبقى غير مفهومة تماما ، لكن ببساطة فأن الكروموسوم المتضاعف يكون مرتبط بغشاء في منتصف الخلية و هذا يمنع بداية انقسام الخلية من هذة النقطة ، وعند انتهاء التضاعف تنفصل الجزيئتان (DNA) الى أقطاب الخلية و بذلك تتحرر منطقة بداية انقسام الخلية.

أن السيطرة على بدء التضاعف عملية صعبة جدا تعتمد على أشارات عندما تصل الخلية الى الكتلة الحرجة. وتتطلب عملية البدء بروتين يدعى Dna A الذي يرتبط بتتابعات محددة على DNA تدعى Dna A boxes . والتي يوجد العديد منها على نقطة اصل التضاعف (Ori.C) تساهم في فتح شريطا DNA لبدء التضاعف.

2- التعبير الجيني Gene expression

تتضمن عملية تعبير الجين تحويل المعلومات الوراثية الموجودة في الشريط المشفر (Coding Strand) في DNA الى بروتين فعال من خلال خطوتين هما الأستنساخ والترجمة .

2-1 الأستنساخ Transcription :

هو الخطوة الأولى من عملية التعبير الجيني وتتضمن تحويل المعلومات الوراثية في الشريط المشفر في DNA الى RNA بواسطة انزيم الأستنساخ RNA Polymerase . من المعروف ان جزيئة DNA تتكون من شريطين متعاكسين بالاتجاه أحدهما الشريط المشفر أو الفعال (Sense strand) أو (+Ve) بالأتجاه 3^{-} الى 5^{-} والثاني هو الشريط الخامل غير المشفر وهو antisense بالأتجاه 5^{-} الى 3^{-} .

يختلف أنزيم الأستنساخ (RNA Polymerase) في بدائية النواة عنه في الحقيقية، ففي بدائية النواة (مثال عليها بكتريا *E. coli*) يتكون من خمس وحدات صغيرة (5 Subunits) هي ααββб عندما يكون أنزيم كامل (Holo enzyme) ، تكون تحت الوحدة سكما (б) مهمة للتعرف على منطقة الحفاز (Promotor) الموجودة في بداية الجين والتي تبدأ منها عملية الأستنساخ ، وعندما يفقد الانزيم تحت الوحدة سكما يصبح Core enzyme ويتكون من ααββ وهذا الانزيم لا يتمكن من الأرتباط مع الحفاز وبذلك يكون أستنساخه بشكل عشوائي ، من جانب أخر في بدائية النواة يكون هناك نوع واحد من أنزيم الأستنساخ يقوم بأستنساخ جميع أنواع RNA (mRNA و rRNA و tRNA).

في بكتريا *E. coli* هناك 2000-5000 نسخة من هذا الانزيم (نفس النوع) تساهم في بناء mRNA في الوقت نفسه .

أما في حقيقية النواة يكون الأنزيم أكثر تعقيداً وذا وزن جزيئي عالي يتألف من وحدتين كبيرة أضافة الى عشرة وحدات صغيرة مع بروتين صغير يدعى Transcription factor .

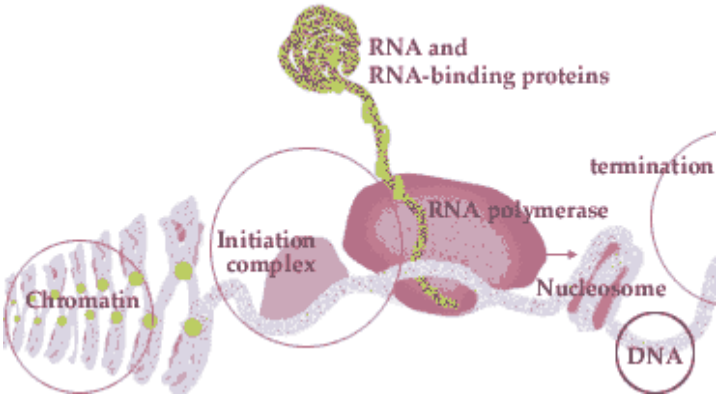
هناك ثلاث أنواع من أنزيم الأستنساخ في حقيقية النواة هي:

RNA Polymerase 1 يوجد في النوية ويقوم باستنساخ الجينات المسؤولة عن صنعrRNA (نوع 28 S و 18 S) .

RNA Polymerase Π يقوم باستنساخ الجينات المسؤولة عن mRNA .

RNA Polymerase ΙΙΙ يقوم باستنساخ جينات tRNA أضافة الى قسم من جينات rRNA (نوع 5 S).

هناك أختلاف اخر مهم في انزيم الأستنساخ في بدائية النواة عنه في الحقيقية هو أن هذا الانزيم يكون حساس لمضاد الريفامبسين في البدائية أذ تكون الوحدة β في البدائية موقع هدف لمضاد الريفامبسين وبالتالي يحصل تثبيط عملية الاستنساخ ، أما أنزيمات الحقيقية فتكون غير حساسة لهذا المضاد .



شكل 22: أنزيم الأستنساخ RNA Polymerase مرتبط بشريط DNA.

يقوم أنزيم الاستنساخ ببناء جزيئة RNA بالأتجاه 5^{-} الى 3^{-} بأضافة رايبونيوكليوتيدات (Ribonucleotids) الى النهاية $3^{-}OH$ ويبلمر عدد كبير من هذه النيوكليوتيدات.

تتضمن عملية الاستنساخ ثلاث مراحل هي : مرحلة البدء (Initiation) ومرحلة الاستطالة (Elongation) ومرحلة الأنتهاء (Termination) .

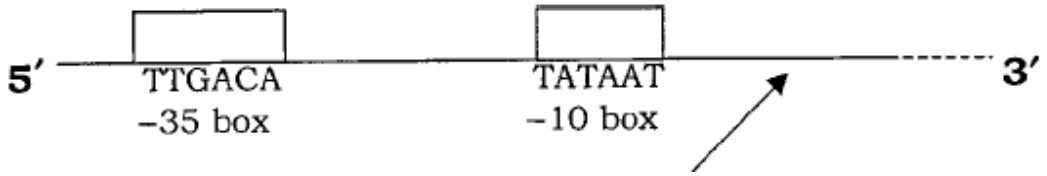
مرحلة البدء

يرتبط أنزيم الأستنساخ بقالب DNA بمكان محدد وقريب من الجين المطلوب أستنساخه بمنطقة الحفاز (Promotor) وهو تسلسل من النيوكليوتيدات على DNA يتعرف عليها انزيم الأستنساخ من خلال الوحدة σ ويرتبط بها لبدء عملية الأستنساخ وتقع هذه التسلسلات القصيرة في بداية الجين المطلوب استنساخه .

تختلف منطقة الحفاز في بدائية النواة عنها في الحقيقية ، أذ تتألف في بدائية النواة من مناطق 10- و 35- .

تكون التتابعات لمنطقة 35- هي TTGACA وهي المنطقة التي يتعرف عليها أنزيم الأستنساخ ضمن الحفاز أما منطقة 10- فتدعى صندوق بريبنو (Pribnow box) وتكون تسلسلاتها TATAAT وهي منطقة أرتباط انزيم الاستنساخ مع الحفاز ومنها ينفتح شريطا DNA عن بعضهما . مناطق الحفاز في حقيقية النواة هي 25− و 75− وتعرف منطقة 25− بصندوق Hogness box .

تعرف هذه التسلسلات للقواعد النايتروجينية بتتابعات Consensus Sequences وهي تحدد قوة الحفاز.



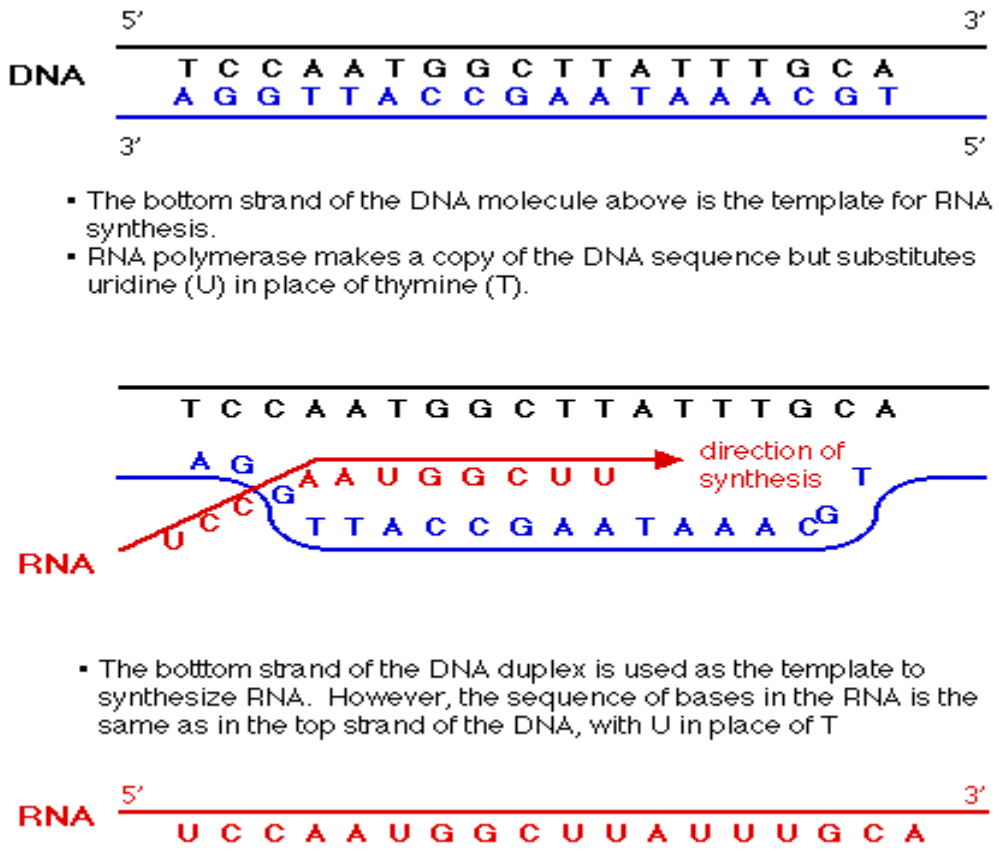
شكل 23: الحفاز في خلايا بدائية النواة ، نلاحظ مناطق 10- و35- .

تبدء عملية الأستنساخ بأرتباط أنزيم RNA Polymerase بالحفاز ليكون معقد الحفاز المغلق (Closed promoter complex) والذي يغطي 60 زوج قاعدة من الحلزون المزدوج ، يقوم الانزيم بتمييز الحفاز من خلال المنطقة 35 – على الحفاز ومن خلال الوحده σ بالانزيم وبعد ان يرتبط بالحفاز يقوم الجزء الاخر من الانزيم (β) بفتح شريطا الحلزون المزدوج من منطقة 10− أذ يتم تكسير الآصره الهيدروجينية الرابطة للشريطين (Melting) ليتكون بعدها معقد الحفاز المفتوح (promoter complex Open).

يتم فتح الشريطين من منطقة 10- بالتحديد لأنها غنية بالقواعد T و A والتي تربط بينها اصرة ثنائية يكون كسرها أسهل للأنزيم مقارنة بالأصرة الثلاثية الرابطة بين قواعد C و G التي تكثر في منطقة 35- . بعد فتح الشريطين تكون القواعد النايتروجينية مكشوفة على الشريط المشفر وبالتالي يبدأ أنزيم الأستنساخ في عمله ببناء نسخة RNA حسب القواعد النايتروجينية الموجودة على الشريط المشفر لجزيئة DNA ثم تضاف أول رايبونيوكليوتيدة في منطقة 1+ ثم 2 + وتتكون بينهما أصرة فوسفاتيه ثنائية الأستر () Phosphodiester bondبعد ان يتكون معقد الحفاز المفتوح يفقد الانزيم الوحدة سكما لان دورها انتهى ويعود بشكل Core enzyme ترتبط هاتان النيوكليوتيدتان مع الشريط المشفر لجزيئة DNA بآصرة هيدروجينية فيتكون هجين (RNA – DNA) ثم يستمر بأضافة الرايبونيوكليوتيدات بطول عشر رايبونيوكليوتيدات فتكتمل مرحلة بدء الاستنساخ بتكوين هذا البادىء القصير من RNA.

مرحلة الاستطالة

يبدأ انزيم Core enzyme بالتحرك على طول الجين المطلوب أستنساخه ويقوم بفتح شريطا DNA وأضافة الرايبونيوكليوتيدات الى نسخة RNA النامية بالأتجاه $^{-}3$ أي تبنى نسخة RNA بالأتجاه $^{-}5$ الى $^{-}3$ وهو عكس أتجاه الشريط المشفر لقالب DNA $^{-}3$ الى $^{-}5$.
من المهم ان نعرف ان في الاستنساخ لا يتم فتح شريطا الحلزون المزدوج بالكامل في نفس الوقت كما هو الحال عند تضاعف DNA أنما تكون المنطقة المفتوحة دائماً ثابتة بحدود 2 الى 17 زوج قاعدة لان الجزء المفتوح من DNA يعود للأزدواج بعد ان يكتمل أستنساخه .



شكل 24: بناء RNA على الشريط المشفر لجزيئة DNA.

يبدء الأستنساخ من منطقة قبل الجين نفسه (قطعة leader segment) ويستمر الأستنساخ الى منطقة بعد الجين (Trailer segment) لذلك نلاحظ ان نسخة RNA المستنسخة (Transcript) تكون أطول من الجين نفسه .

مرحلة الأنهاء

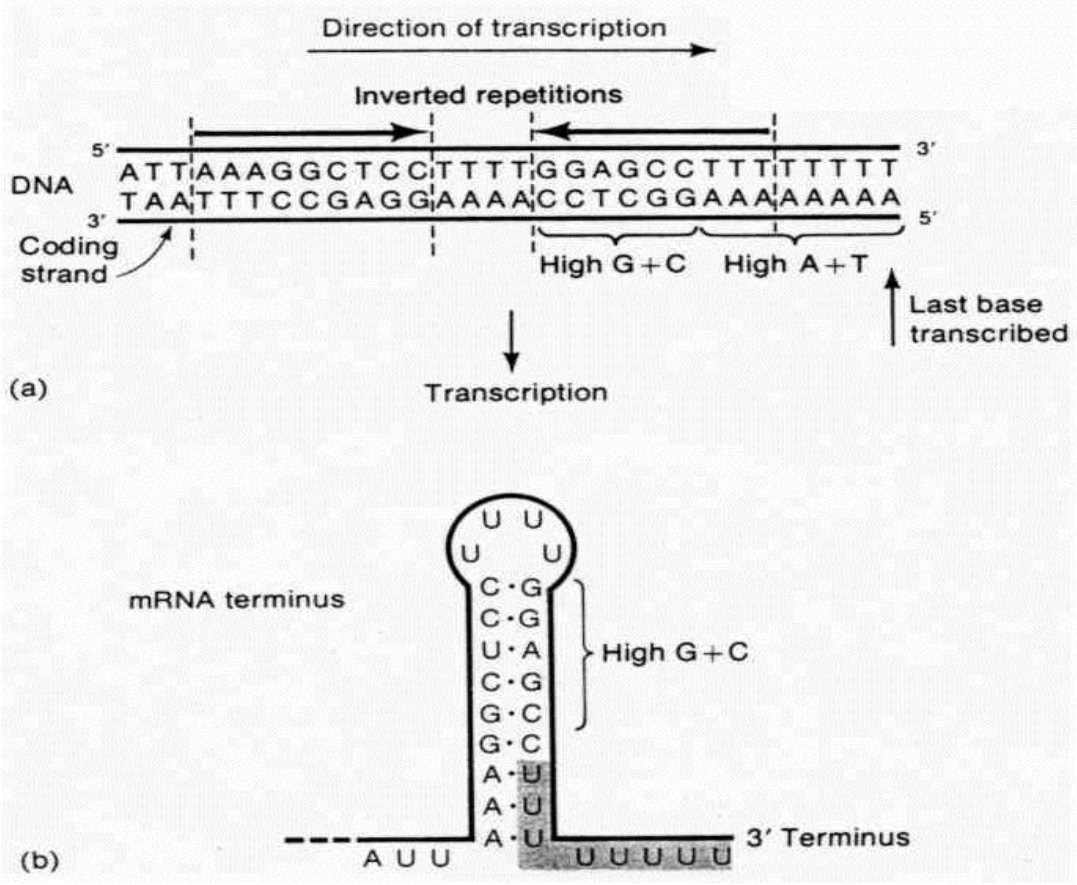
بعد ان يكتمل أستنساخ الجين المطلوب ينتهي الاستنساخ في منطقة محددة على DNA (عملية منظمة جداً غير عشوائية) لكن كيف يعرف انزيم الاستنساخ أنه يجب الأنهاء في هذه المنطقة ؟ وجد أن الأستنساخ في بكتريا *E.coli* ينتهي اعتماداً على :

1) وجود تسلسل من القواعد على شريط DNA في نهاية الجين غنية بالقواعد C و G تليها منطقة غنية بالقواعد A و T عند أستنساخها الى RNA تستنسخ الى U و A . تدعى هذه المناطق في DNA بالتتابعات المعكوسة (Inverted repeats) او (Palindrome تقرأ من اليمين الى اليسار وبالعكس) وتدعى ايضاً dyad symmetry عند أستنساخها يتكون

تركيب شبيه بدبوس الشعر (Hair pin) او (team Loop Structure) له ذيل من قواعد اليوراسيل (5 الى 10) هذا التركيب يؤثر على أستقرار الهجين RNA : DNA وبالتالي ينفصل mRNA النامي وينتهي الأستنساخ. ارتباط A مع U يكون ضعيف وبالتالي يكون من السهل انفصالهم عن بعضهم ، هذا النوع من الانهاء يكون غير معتمد على بروتين Rho (Rho independent Termination).

2) أنهاء معتمد على بروتين Rho (Rho dependent Termination): وجد ان هناك بروتين صغير يعرف ببروتين Rho يرتبط مع شريط RNA النامي عندما يصل الأستنساخ الى النهاية ويفصله عن DNA القالب وتتوقف عملية الأستنساخ.

وبعد انتهاء عملية الاستنساخ ينفصل الانزيم RNA Polymerase وترتبط به б من جديد ليعود دورة أستنساخ جديدة .



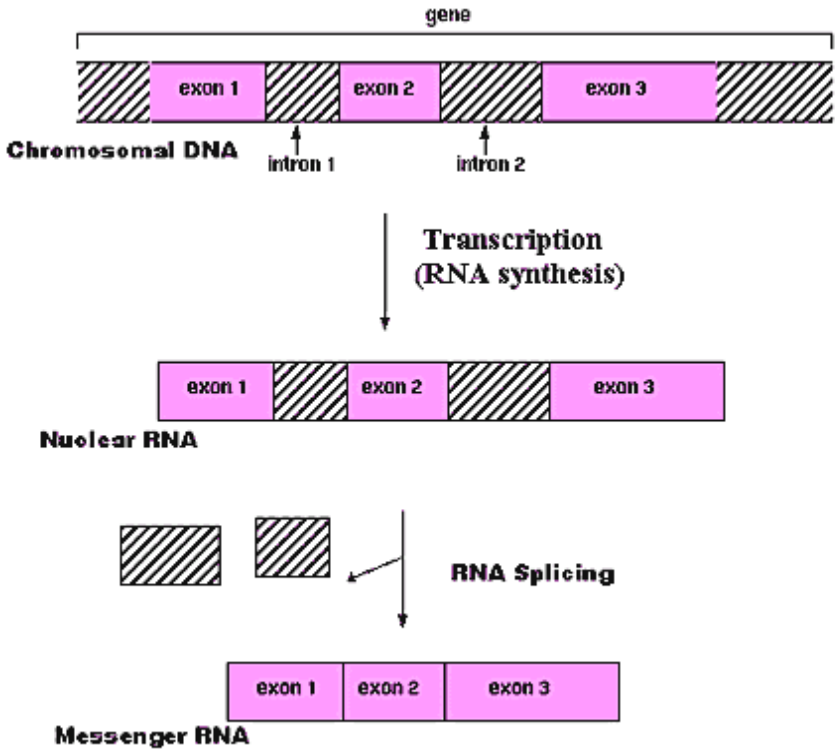
شكل 25 : مرحلة أنتهاء عملية أستنساخ الجين يلاحظ a) التتابعات المعكوسة.

b) تكوين Steam Loop Structure.

تحويرات بعد الأستنساخ:

هناك تحويرات تحصل لجزيئة RNA بعد أستنساخها على الشريط المشفر لجزيئة DNA وهي عملية معالجة الحامض النووي RNA (RNA Processing) والتي تتضمن:

1) المعروف ان خلايا بدائية النواة تحتوي على جينات متصلة ضمن الشريط المشفر في DNA لا يفصل بينها تسلسل غير جيني (Introns) وبالتالي عند أستنساخها تنتج نسخة من RNA يمكن ان يترجم بنفس الوقت حتى أثناء عملية الأستنساخ ، لكن الامر مختلف في حقيقية النواة التي تمتاز بوجود Split genes (الجينات المنشطرة) والتي تحتوي على تسلسلات مشفرة (exons) تتخللها مناطق غير مشفرة (introns) . عند الاستنساخ تستنسخ الانترونات والأكسونات ثم بعد الأستنساخ تعالج الأنترونات وتزال وتبقى المناطق الجينية المشفرة (الأكسونات) التي تترجم فيما بعد الى بروتينات بعملية الترجمة ، لذلك فأن عملية الأستنساخ تكون منفصلة عن الترجمة في حقيقية النواة . وتتم المعالجة للأنترونات من خلال آنزيمات قاطعة تهاجم تسلسلات معينة في المناطق الفاصلة بين الأنترون و الاكسون وتقطع وتزيل الأنترون ثم يتم لحم الأكسونات مع بعضها وهذه العملية تدعى Splicing .



شكل 26: عملية Splicing التي تتضمن أزالة introns ولحم exons .

2) يتم أضافة تركيب القبعة (Cap Structure) وهو 7mG يضاف الى النهاية 5¯ لشريط mRNA النامي في حقيقية النواة وأضافة متعدد الأدينوسين Poly A الى النهاية 3¯ له (في بدائية النواة تضاف CCA الى النهاية 3¯) ، يضاف تقريباً 150 - 200 أدينوسين الى النهاية 3¯ بواسطة الآنزيم Terminal transferase .

الجدير بالذكر ان جزيئات rRNA و tRNA تعاني أيضاً من عمليات تقطيع ومعالجة كما في حالة mRNA . يخضع mRNA لعملية الترجمة لصنع البروتين اما tRNA فهو ناقل للأحماض الأمينية أثناء تصنيع البروتين ، أما rRNA فيكون من ضمن مكونات الرايبوسوم . لايحتوي mRNA في بدائية النواة على أنترونات مستنسخة من DNA ، ولا يخضع لعملية معالجة ، وتكون الترجمة مرافقة للأستنساخ ، وغالباً ما يكون mRNA نوع Polycistronic اما في الحقيقية فيكون نوع monocistronic (معنى Cistron هي منطقة DNA المشفرة لسلسلة Polypeptide مفردة) ، وهو لا يترجم الا بعد نقله من النواة الى السايتوبلازم. وظيفة تركيب القبعة غير معروفه تماما لكن له دور في حماية mRNA وله دور في عملية الترجمة.

2 -2 الترجمة **Translation**

مرحلة الترجمة هي الخطوة الثانية من عملية التعبير الجيني وتتضمن تحويل المعلومات الوراثية في mRNA الى بروتين ، أركان عملية صنع البروتين (الترجمة) هي mRNA والرايبوسومات و tRNA .

بالنسبة لشريط mRNA فأنه يحتوي في تركيبه على الشفرات الوراثية والتي تكون ثلاثية (Triplet codon) ، والشفرة الوراثية هي عبارة عن ثلاث نيوكليوتيدات موجودة على mRNA تشكل الاساس الكيميائي للمعلومات الوراثية وهي تعطي الأختلافات بين الكائنات الحية ، وتكون الشفرة ثلاثية ، عالمية وغير متداخلة ، لا يفصل بينها فواصل أو فراغات وتقرأ بأتجاه واحد $3^- \rightarrow 5^-$.

هناك 64 شفرة مختلفة في الخلية ، ثلاث منها شفرات أنهاء لا تشفر لأي حامض أميني (UAG و UGA و UAA) و 61 شفرة تشفر الى 20 حامض أميني . كذلك يحتوي mRNA على شفرة البدء AUG التي تبدأ منها عملية الترجمة .

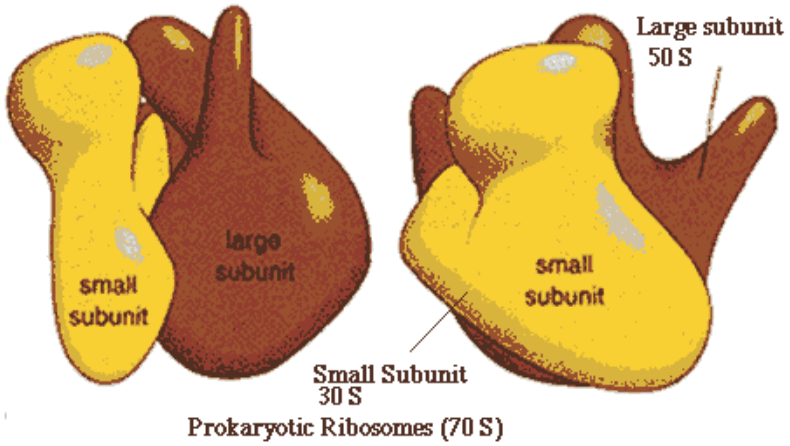
First base in codon	*Second base in codon*				*Third base in codon*
	U	**C**	**A**	**G**	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	**U**
	Phe	Ser	Tyr	Cys	**C**
	Leu	Ser	—	—	**A**
	Leu	Ser	—	Trp	**G**
C	Leu	Pro	His	Arg	**U**
	Leu	Pro	His	Arg	**C**
	Leu	Pro	Gln	Arg	**A**
	Leu	Pro	Gln	Arg	**G**
A	Ile	Thr	Asn	Ser	**U**
	Ile	Thr	Asn	Ser	**C**
	Ile	Thr	Lys	Arg	**A**
	Met	Thr	Lys	Arg	**G**
G	Val	Ala	Asp	Gly	**U**
	Val	Ala	Asp	Gly	**C**
	Val	Ala	Glu	Gly	**A**
	Val	Ala	Glu	Gly	**G**

شكل 27: الشفرات الوراثية والأحماض الأمينية التي تشفر لها.

أما الرايبوسومات فتتكون من بروتين مع حامض rRNA وتعد معمل صنع البروتين في الخلية . في بدائية النواة تكون الرايبوسوم الكامل 70S (S = Svedberg unit). وهي تتجزء

الى وحدتين: صغيرة 30 S وكبيرة 50 S ، الوحدة الكبيرة تحتوي على rRNA (23 S و 5 S). أما الوحده الصغيرة فتحتوي على حامض rRNA (16 S) .

أما في حقيقية النواة فتكون الوحدة الكاملة 80S (الصغيرة 40S والكبيرة 60S)، الصغيرة تحوي rRNA (18S) و الكبيرة (5 S و 28 S).



شكل 28: الرايبوسوم في بدائية النواة ، الوحدتين الصغيرة والكبيرة مرتبطتين مع بعضهما.

تكون عملية الترجمة في بدائية النواة ملازمة لعملية الأستنساخ (ترجمة فورية)، وهذا مهم لتوفير أحتياجات الخلية من البروتينات بسرعة وبصورة مستمرة خاصة أذا عرفنا ان خلايا بدائية النواة تنقسم بصورة سريعة ، كذلك فأن خلايا بدائية النواة لا تحتوي على غلاف نووي يحفظ mRNA المستنسخ من الأنزيمات الهاضمة لجزيئة RNA لذلك فأن ترجمته بشكل سريع يساعد على عدم فسح المجال أمام هذه الأنزيمات لتقطيع mRNA .

تمر عملية الترجمة بثلاث مراحل هي :

مرحلة البدء : Initiation

مرحلة الأستطالة: Elongation

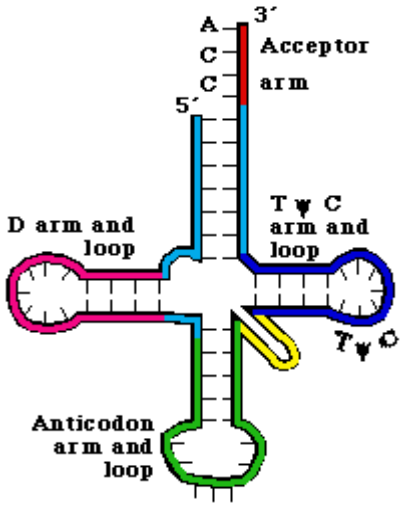
مرحلة الأنهاء : Termination

مرحلة البدء

تقوم الوحدة الصغيرة للرايبوسوم (30 S في بدائية النواة) ومن خلال حمضها النووي rRNA (16 S) بتمييز أماكن أرتباط الرايبوسوم (Ribosome Binding Site) (RBS) التي تقع قبل شفرة البدء وتعرف في بدائية النواة بتسلسل (شاين– دالكارنو) (Shine-Dalgarno) وهي تسلسلات محددة متممة لتسلسلات 16S (حامض الرايبوسوم) تساهم في أرتباط الرايبوسوم بشريط mRNA ، أما في حقيقية النواة فلا يوجد هذا التسلسل أنما يلعب تركيب القبعة دوراً في ارتباط الرايبوسوم الصغير(40S) مع mRNA . بعد ذلك تتدحرج الرايبوسوم الصغيره باتجاه شفرة البدء بمسافه (تقريباً 7 نيوكليوتيده) ثم ترتبط بشفرة البدءِ AUGوهنا تبدء عملية ترجمة المعلومات الوراثيه الموجوده في mRNA (شفرات وراثيه) الى أحماض امينيه ،أذ يكون لكل شفره حامض اميني معين (عدا في حالات معينه هناك اكثر من شفره لنفس الحامض الاميني وهو ما يعرف بانحلال الشفره)، ويقوم tRNA بجلب الحامض الاميني الى موقع صنع البروتين .

تكون جزيئة tRNA أكثر استقراراً من mRNA وتقوم بحمل الاحماض الامينيه المناسبه الى الرايبوسوم (المكان الذي يتم فيه صنع البروتين في الخليه) ، وتتكون من أربع مناطق ذات اشرطه مزدوجه (Loop) . لكل منطقه وظيفه خاصة وتسلسل خاص من النيوكليوتيدات. هناك الذراع المستقبل ينتهي بالأدنين يرتبط بالحامض الاميني المحدد وهناك الذراع في الاسفل مضاد للشفره يرتبط بالشفره الثلاثيه على mRNA وهذه الشفره هي التي تحدد نوع الحامض الاميني الذي سيرتبط بحامض tRNA ، على سبيل المثال اذا كانت الشفره GAC فهذا يعني أن الحامض الاميني هو الاسبارتيت وهكذا.

عملية أرتباط الحامض الأميني بحامض tRNA تدعى تحميل أو شحن (Charging) أو Aminoacylation من خلال تكوين أصرة تساهمية بين مجموعة COOH للحامض الأميني مع مجموعة 3`OH للنيوكليوتيد الطرفي لحامض tRNA ويدخل بهذه العملية أنزيم Aminoacyl tRNA Synthetase .



شكل 29 : جزيئة الحامض النووي tRNA.

هناك قواعد نايتروجينيه محوره انزيمياً توجد فقط في tRNA مثل dihydrouridine (D)، و Thymidine (T) و Pseudouridine (ψ) . بعد ارتباط الوحده الصغيره للرايبوسوم بشفرة البدء في mRNA يقوم tRNA بجلب الحامض الاميني الاول وهو المثيونين (في حالة البكتريا) أذ تشفر AUG لهذا الحامض الاميني ،عند ارتباط tRNA الحامل للميثيونين بشفرة AUG بوجود المترجم 30S يتكون معقد البدء (Initiation Complex) وهو المعقد المتكون من شفرة البدء AUG على mRNA و 30S للرايبوسوم و tRNA الحامل للميثيونين المفرمل (Formyl methionine) ، يتم أضافة مجموعة الفورمايل للميثيونين لكي يتم غلق الطرف الاميني N بحيث تتم ألاضافه لاحقاً الى الطرف الكاربوكسيلي للحامض الاميني .

تعد شفرة AUG شفرة بدء بصوره عامه لكن في حالات معينه قد تكون شفرة البدء GUG وفي حالات قليله جداً تكون CUG.

هناك عوامل بروتينيه تساعد في عملية البدء هي عوامل البدء Initiation factors (IF) وهي ثلاث أنواع في بدائية النواه وتسع في حقيقية النواه . تتضمن عوامل البدء في بدائية النواة :

IF1= يعمل على فصل الرايبوسوم الى وحداتها الفرعية.

IF2= يربط tRNA بمعقد البدء.

IF3= يفصل الرايبوسوم الى وحداتها الفرعية ، أضافه الى قيامه بربط mRNA بمعقد البدء.

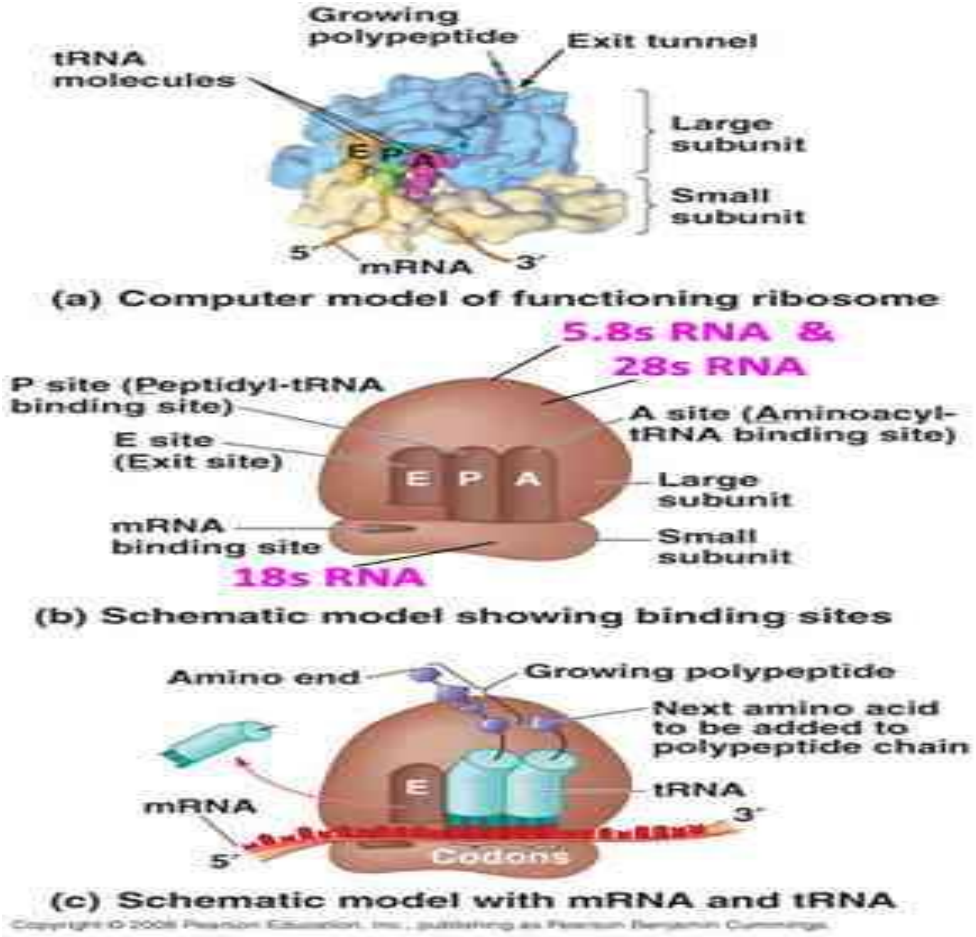
بعد ذلك ترتبط الوحده الكبيره للرايبوسوم 50Ş بمعقد البدء فتعود بذلك الرايبوسوم الى 70S (بالنسبه للبدائيه) لتبدء بعد ذلك مرحلة الاستطاله.

مرحلة الأستطالة

يحتوي الرايبوسوم الكامل 70S على موقعين يمكن ان يرتبط من خلالهما tRNA المشحون بالحامض الاميني هما P-Site (Peptidyl Site) وهو الذي يكون مشغول بحامض tRNA الحامل للمثيونين المفرمل ، اما الموقع الثاني فهو A-Site (Aminoacyl site) الذي يكون فارغ بأنتظار tRNA حامل لحامض اميني جديد. بعد ترجمة الشفره الثانيه من قبل الرايبوسوم يقوم tRNA بجلب حامض اميني حسب الشفره الوراثيه ثم يرتبط بالموقع A-Site . تتكون أصره ببتيديه بين الحامضين ألامينيين المتجاورين في الموقعين A و P والمحمولين على جزيئتين tRNA بواسطة انزيم (Peptidyl Transferase) ثم يقوم انزيم (decaylase tRNA) بتحرير الحامض الاميني F-methionin من tRNA الاول بكسر الاصره الرابطه بينهما وبالتالي يبقى الحامض الاميني .F-meth مرتبطاً بالحامض الاميني في الموقع الثاني ويذهب tRNA الاول ليبدء عمله من جديد. بعدها تتحرك الرايبوسوم الى شفره جديده فيحصل تغيير مواقع ، الموقع A يصبح P ويكون هناك موقع A جديد وهذه العمليه تعرف بعملية Translocation ، اما الموقع القديم (موقع P سابقا) فيعرف بموقع E-Site (Exit site) .

تحتاج عملية Translocation الى عوامل مساعده هي عوامل الاستطاله (Elongation factors) مثل Ef-TU و Ef-TS و Ef-G وهي تحتاج الى طاقه، يقوم Ef-TU بربط tRNA المشحون بموقع A ، ويعمل Ef-TS على توليد طاقة مهمة لعمل EF-TU ، ويقوم EF- G بتبديل المواقع (Translocation).

يقوم tRNA جديد بجلب حامض اميني حسب ما موجود بالشفره الموجوده في الموقع A وهكذا تستمر عملية استطالة سلسلة Polypeptide بأضافة أحماض أمينيه تباعاً حسب الشفرات الموجوده على mRNA . يمكن ان تحصل الترجمة بوجود اكثر من رايبوسوم واحد بنفس الوقت تتصل بحامض mRNA وهو مايعرف ب Polyribosome او Polysome وهي موجوده في بدائية وحقيقية النواة .

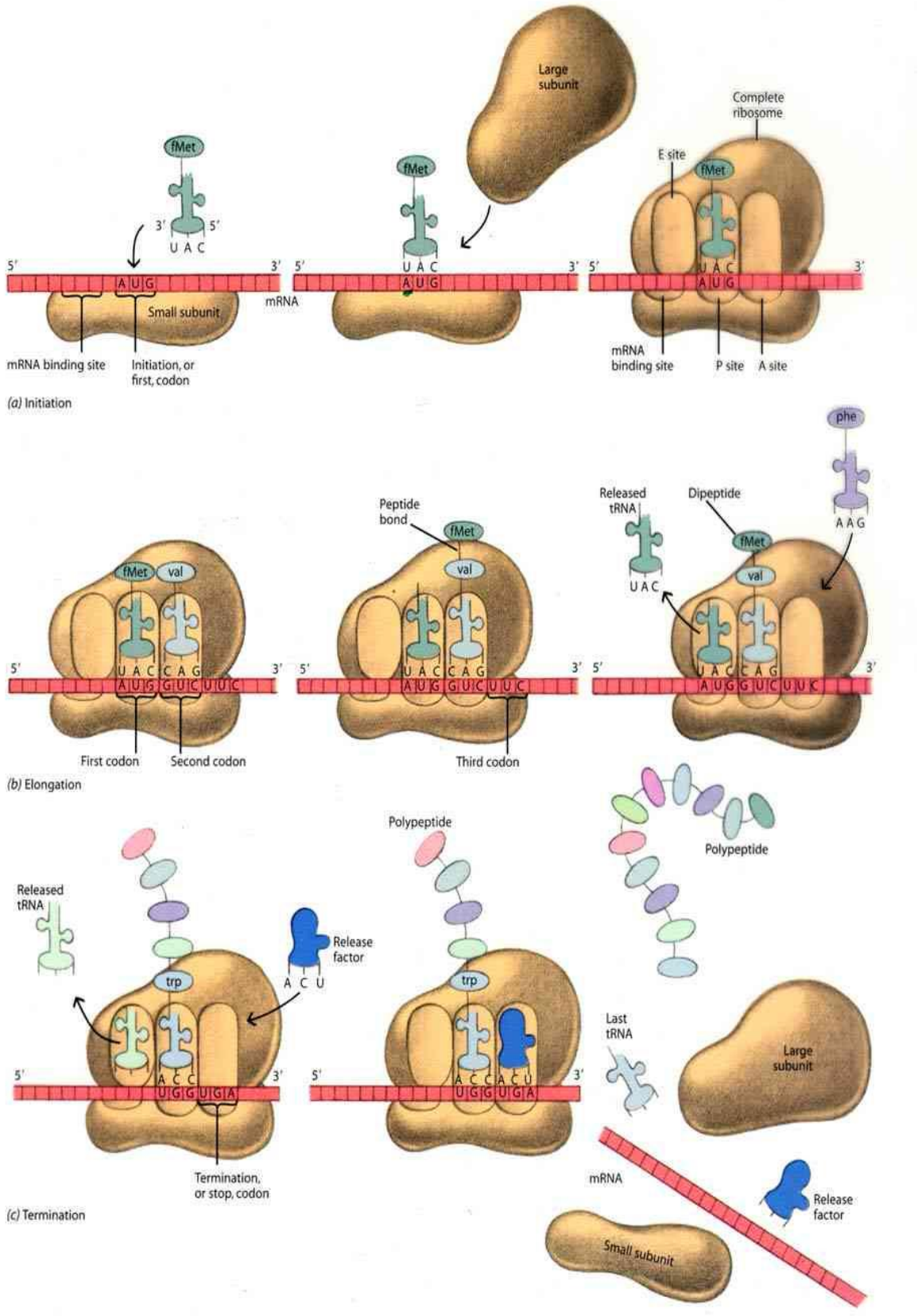


شكل 30: يوضح دور الرايبوسوم في عملية الترجمة(A : نموذج يبين أجزاء الرايبوسوم
B :نموذج يبين مواقع A,P,E في الرايبوسوم C : نموذج يبين تكون سلسلة البولي ببتيد)

مرحلة الانهاء

تستمر أستطالة سلسلة Polypeptide وقراءة الشفرات الوراثية الى أن تصل الرايبوسوم الى شفرة أيقاف (Stop codon) وهي أحدى شفرات الانهاء UAG , UGA , UAA والتي لا تشفر لأي حامض أميني ولا تميز بحامض tRNA وهنا يتدخل أيضاً أحد عوامل الأنهاء (Release factors) RF والذي يقوم بكسر الأصرة الرابطة لحامض tRNA وتفصله عن

سلسـلة البـولي ببتيـد . بعـدها تتجـزء الرابيوسـوم الـى الوحـدات30S و50S .



يوضح الشكل أعلاه (الشكل 31) : مراحل عملية الترجمة a) البدء b) الأستطالة c) الأنهاء.

تتضمن عوامل الأنهاء العامل RF1 الذي يحرر سلسلة البولي ببتيد من شفرات UAG و UAA ، والعامل RF2 الذي يعمل على تحرير سلسلة البولي ببتيد من شفرات UAA و UGA ، ويقوم العامل RF3 بمساعدة عمل RF1 و RF 2 .

الفصل الثالث

البلازميدات والجينات المتنقلة

أولا : البلازميدات البكتيرية Bacterial Plasmids

البلازميدات (قطع DNA أضافية خارج الكروموسوم) عبارة عن مادة وراثية تكون DNA مزدوجة الشريط تتضاعف ذاتيا وتنتقل بصورة مستقلة عن الكروموسوم (يمكن ان توجد بلازميدات RNA كما في بعض الخمائر) ، تحمل جينات تمنح الخلية صفات جديدة مهمة احيانا، لكن على العموم تعد البلازميدات غير ضرورية لحياة الخلية ، وتظهر اهميتها في ظروف معينة تتطلب وجود هذه البلازميدات.

هناك اختلافات عديدة بين البلازميد والكروموسوم من حيث التضاعف والقواعد النايتروجينية والكثافة والحجم ووظائف الجينات المحمولة، وبأمكان البلازميدات ان تغير في مواصفاتها من خلال التحامها مع كروموسوم الخلية وحصولها على جينات كرموسومية ،او بالتبادل الوراثي فيما بينها.

1-1 أنواع البلازميدات

هناك أنواع عديدة من البلازميدات في الخلايا البكتيرية أهمها:

بلازميد F : بلازميد عامل الخصوبة و تحديد جنس البكتريا (Fertility Plasmid) ، يمتاز بكونه يحمل جينات مسؤولة عن تكوين جسر الاقتران (Sex pilus) او أنبوبة التزاوج وله القابلية على الانتقال من خلية الى اخرى وقد يحمل معه جينات كروموسومية.

بلازميد R : بلازميد المقاومة (Resistance Plasmid) يحمل جينات مسؤولة عن مقاومة بعض مضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وايضا له القابلية على الانتقال من خلية الى اخرى.

بلازميد Col : بلازميد الكولسين (Colicinogenic Plasmid) يحمل جينات مسؤولة عن انتاج الكولسين (من البكتريوسينات) وهي بروتينات قاتلة للبكتريا الحساسة لها ، ينتج الكولسين من بكتريا *E coli* وتدعى السلالات المنتجه ب Colicinogenic . يحمل الجين المشفر للكولسين على البلازميد ويكون مرتبطا مع جين ثاني يشفر لمناعة ضد فعل الكولسين ، يحمي الخلية ضد الفعل القاتل للناتج نفسه.

بلازميدات الضراوة Virulence Plasmids:

تحمل جينات أنتاج السموم في بعض الأنواع البكتيرية على بلازميد كما في سلالات بكتريا *E. coli* القادرة على أحداث مرض مشابه للكوليرا ،اذ تنتج هذه السلالات سم يعرف بLabile toxin (LT) لتمييزه عن سم Heat Stable toxin (ST) ، سم LT له علاقه بسم الكوليرا ، الأ أن جين الكوليرا يكون محمولا على عاثي بينما يكون جين LT في بكتريا *E. coli* محمولا على بلازميد .

يعد بلازميد الضراوه في بكتريا *Yersinia* (70 كيلو زوج قاعدة) الموجود في النوع *Y. pestis* المسبب للطاعون مثالا أخرا على بلازميدات الضراوة ، وجينات الضراوة المحمولة على بلازميد عامل Invasion / adhesion في بكتريا *Shigella* وسم الكزاز لبكتريا *Clostridium tetani* تعد أمثله أخرى على الجينات المحمولة على بلازميدات الضراوة.

البلازميد المحفز للورم Tumer Inducing Plasmid (TI):

يوجد هذا البلازميد في بكتريا *Agrobacterium tumifeciens* المسببة للورم التاجي شبيه السرطان في بعض النباتات، وهو يحفز النسيج المصاب لأنتاج مادة (Opines) المفيدة للبكتريا الحاوية على البلازميد وهناك انواع من بلازميد Ti حسب نوع الـ Opines التي يحفز على أنتاجها مثل : Octopine Plasmid المحفز على انتاج الاكتوبين و Nopaline Plasmid المحفز على انتاج النوبالين و Agropine Plasmid المحفز على انتاج الاكروبين .

وجد ان الجزء الاساس في بلازميد Ti المحفز على تكوين الورم التاجي هو Transferred DNA (T-DNA) وهو الذي يندمج مع كروموسوم الخلية النباتية المصابة ببكتريا *Agrobacterium* ويقوم بتحفيز النمو السرطاني ، وقد تم دراسة تسلسل جينات هذا البلازميد بشكل جيد وتم تحديد كيفية أندماج T-DNA في كروموسوم الخلية النباتية وأستعمل بشكل واسع في الهندسة الوراثية.

بلازميدات ذات العلاقه بالفعاليات الأيضية:

هناك بلازميدات قادرة على توسيع مدى الخلايا المضيفه في الفعاليات الأيضيه بطرق مختلفه ، هناك بلازميد يحمل جينات لتخمير اللاكتوز يمكن ان ينتقل الى سلالة لا تخمر اللاكتوز وبذلك تتحول الى سلالة قادرة على أستهلاك اللاكتوز ، مما قد يسبب أخطاء في تشخيص البكتريا مثلا: يتم تفريق بكتريا السالمونيلا عن الأنواع غير المرضية لبكتريا *E.coli* بعدم قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز ، في بعض الحالات يتأخر الكشف عن بعض الأصابات الوبائية بالسالمونيلا كون العامل المسبب يكتسب بلازميد تخمير اللاكتوز .

هناك جينات اخرى توجد على بلازميدات من ضمنها المخمرة لسكريات أخرى مثل السكروز وتحليل اليوريا وأنتاج H_2S . بعض هذه الصفات قد تسبب خطأ في الأختبارات الكيموحيوية التشخيصية.

بلازميدات ذات علاقه بعمليات Biodegredation و Bioremediation:

القابلية على تحطيم المواد الكيميائية السامة قد تتواسط ببلازميدات مثل بلازميد pWWO في بكتريا *Pseudomonas putida* المشفر لأنزيمات تعمل على تحويل الهيدروكاربونات الحلقية toluene و xylene الى benzoate ، وهناك اوبرون مسؤول عن تحطيم benzoate عن طريق كسر حلقة Catechol وسطية في مسار أيضي يمكن ان يستعمل لأنتاج الطاقة والبناء الحيوي.

أن تحطيم المركبات المتواسط بالبلازميدات يتضمن مركبات النفثالين و Camphor أضافه الى المركبات الأروماتيه مثل 3-Chlorobenzoate والمبيدات العشبية و 2,4 D (Dichlorophenoxy acetic acid) .

تعد قابلية تحطيم المواد الكيمياوية في البيئة مفيدة ومهمة لتنظيف مواقع الملوثات (Bioremediation) ،هناك سلالات كفؤه في حملها لبلازميدات تشفر لمقاومة الأيونات المعدنية السامة مثل النحاس والزئبق .

1-2 الخواص الجزيئية للبلازميدات:

تكون البلازميدات صغيرة عادة (عدد من كيلو زوج قاعدة) وقد تصل أحيانا الى عدة مئات من كيلو زوج قاعدة كما في بلازميدات بكتريا *Pseudomonas* .

هناك مجموعتين من البلازميدات في بكتريا *E.coli* :

أ- **تضم المجموعة الأولى** بلازميد Col E1 وهو بلازميد صغير نسبيا (أقل من عشر كيلو زوج قاعدة) موجود بنسخ متعددة في الخلية ، يتضاعف بمعزل عن الكروموسوم وأنقسام الخلية.

يستمر تضاعف البلازميدات تحت ظروف معينة (تمنع تضاعف الكروموسوم) مما يسبب زيادة معتبرة في عدد نسخ البلازميد في الخلية بظاهرة تعرف بتضخيم البلازميد (Plasmid amplification).

ب- **تضم المجموعة الثانية** بلازميد F وهو كبير الحجم (**أكبر من 30 كيلو زوج قاعدة**) موجود بنسخة أو نسختين في الخلية ، ولا يمكن تضخيم هذه البلازميدات وهي بلازميدات اقترانية لها القدرة على الأنتقال بالأقتران.

عندما يوجد بلازميد Col E1 (6.4 kbp) بثلاثين نسخة في الخلية الواحدة فأنه يشكل 4 % من DNA الكلي في الخلية، بينما بلازميد F (100 kbp) فعند وجوده بثلاثين نسخة في الخلية الواحدة فأنه يشكل 70 % من DNA الكلي في الخلية مما يجعل الخلية تنمو ببطء وعندها تفقد البلازميد .

لحدوث عملية الأقتران فأن 30 kbp من بلازميد F (من 100 kbp) تكون مطلوبة لأنتقال البلازميد ، أي أن البلازميد صغير الحجم لا يستطيع حمل جميع الجينات المطلوبة للأقتران.

3-1 تضاعف البلازميدات

تتضاعف بعض البلازميدات كجزيئة دائرية مزدوجة الشريط فتشبه بذلك تضاعف الكروموسوم ، ويبدأ تضاعفها من نقطة ثابته تعرف بنقطة Ori V (Vegetative origine) (تمييزا لها عن نقطة أنتقال الأقتران Ori T) . تبدأ العملية بأتجاه واحد أو بكلا الأتجاهين الى أن تستنسخ جميع الدائرة.هناك أختلافات في بعض المجالات عن تضاعف الكروموسوم خاصة بلازميدات عديدة النسخ مثل Col E1 و R100 :

بالنسبة لبلازميد Col E1 : يبدأ تضاعفه بأنتاج بادئ RNA (RNA 11) يبدء من موقع 555 زوج قاعدة عن Ori V ، يتم قطع RNA 11 بأنزيم RNase 11 (يقطع جزيئات RNA الهجينة مع DNA). هناك منطقة اخرى تدعى RNA 1 تكون في الشريط المعاكس لبادئ RNA11 لأنها تتعارض مع عمل RNase على RNA 11 .

يبقى تضاعف Col E1 مسيطر عليه رغم ان هذا البلازميد يوجد بنسخ عديدة في الخلية هناك جين *rom* (او *rop*) يعمل أيضا كمسيطر على التضاعف يشفر لبروتين يسهل عملية التداخل بين RNA 1 و RNA 11.

البلازميد Col E1 غير أقتراني لا ينتقل بنفسه من خليه الى أخرى لكنه ينتقل بالأقتران أذا وجد معه بلازميد أقتراني في نفس الخلية أي انه متحرك (mobilizable).

بالنسبة لبلازميد R100 : يكون ذو نسخ قليلة في الخلية وهو أقتراني ، يحمل صفة مقاومة مضادات حيوية (تتراسايكلين و كلورمفنكول و ستربتومايسين و سلفونومايد ، أضافة الى أملاح الزئبق). يكون حجم هذا البلازميد 89 كيلو زوج قاعدة . تقع جميع الجينات المطلوبة للأنتقال والأقتران قريبة من منطقة نصف البلازميد مرتبطة مع بعضها قرب أصل التضاعف Ori V بينما جينات مقاومة المضادات تقع كلها على النصف من الجانب الأيمن من البلازميد .يعتقد ان هذه البلازميدات تطورت بأضافة جينات المقاومة الى الجزء الأساسي من البلازميد أي انها تبدأ كبلازميد مجهول (Cryptic) يتألف من منطقة أنتقال وأصل تضاعف ثم تضاف له جينات مقاومة مختلفه.

أحدى ميكانيكيات أكتساب جينات مقاومة خارجية تلاحظ بواسطة محددات مقاومة التتراسايكلين (*tet*) التي تحصر بنسختين من تتابعات ألأقحام IS (IS *10*) موجود في الترانزبوزون Tn *10* الذي يتحرك من موقع DNA الى أخر . أي ان Tn *10* أنتقل الى بلازميد R100 من بلازميد أخر . بلازميد R100 يحتوي نسختين من IS (IS *1*). الترانزبوزون و IS *1* تلعب دورا مهما في تطور البلازميدات.

يحدث تضاعف بلازميد R100 من نقطة أصل واحده ،جين *repA* مهم لبدء التضاعف من نقطة Ori V ، تتم السيطرة على عدد نسخ البلازميد بواسطة جينين تنظم أنتاج بروتين Rep A أحدهما *copB* يشفر لبروتين يثبط أستنساخ جين *repA*.

عند دخول بلازميد R100 الى الخلية البكتيرية أول مرة ، فأن غياب الجين *cop B* يسمح للتعبير عن بروتين Rep A من قبل جين *rep A* . التعبير عن Rep A يحدث بمستوى واطئ من حفاز جين *copB* . الجين المنظم الثاني *copA* ينظم تعبير بروتين Rep A ويشفر هذا الجين ل 90 نيوكليوتيده من RNA غير مترجم . *cop* A RNA يكون مكمل لمنطقة قصيرة لنسخة *rep*A فيرتبط به وبالتالي يتعارض مع ترجمة بروتين Rep A ، تتضاعف عدد نسخ جين *cop A* وتزداد كمية *cop* A RNA .

جين *cop A* مسؤول عن عدم التوافق (Incompatibility) لبلازميدي R100 و R1 ، *cop* A RNA لبلازميد R100 يثبط تضاعف R1 والعكس صحيح مما يسبب فقدان أحدهما عند أنقسام الخلية.

السيطرة على تضاعف البلازميدات بوساطة iterons :

توجد بعض البلازميدات مثل بلازميد F بنسخه واحدة بعد أنقسام الخلية ،أي ان كل خلية تحصل على نسخة من البلازميد لكن في حالة البلازميدات متعددة النسخ قد تحصل خلية على

خمس نسخ من البلازميد وتحصل الأخرى على ستة او أربع ، هناك تتابعات متكررة من DNA بطول 17–22 زوج قاعدة تعرف ب iterons توجد في منطقة بداية التضاعف ، في بلازميد F هناك تسع مكررات من تتابع 17 زوج قاعدة ، يرتبط بروتين Rep A بتتابع iterons عند وجود أكثر من نسخة من البلازميد ، فيرتبط البروتين بتتابع iterons على كلا النسختين فيربطهم ببعض مما يعيق التضاعف اللاحق للبلازميد.

تضاعف البلازميدات الخطية (Linear)

وصفت البلازميدات الخطية في أجناس بكتريا *Borrelia* و *Streptomyces* التي يكون فيها الكروموسوم خطي أيضا . يكون تضاعف جزيئات DNA الخطية كالأتي :

يستمر التضاعف على الشريط العلوي القائد (Leading strand) بالاتجاه 5^{-} الى 3^{-} بوجود Primer واحد ، لكن بالنسبة للشريط الخامل (Lagging strand) لا يوجد Primer. ترتبط نهايات الشريطين في بكتريا *Borrelia* ببعضها في تركيب يشبه الدبوس مغلق بآصرة تساهمية . يحصل تضاعف ثنائي الاتجاه يبدأ من نقطة أصل التضاعف (Ori C) يقود الى تكوين جزيئة حلقية ثنائية الأشرطة، تحصل معالجة بالقطع وإعادة الارتباط لأشرطة DNA في كل نهاية لإعادة تكوين التفافه (Loop) دبوس الشعر مغلقة بآصرة تساهمية.

يوجد في بكتريا *Streptomyces* بروتين طرفي (TP) يرتبط تساهميا للنهايات 5^{-} لجزيئة DNA ، يعمل البروتين كبادئ لبناء DNA يسمح لتضاعف نهايات DNA الخطي .توجد نقطة أصل التضاعف في منطقة وسط جزيئة DNA يحدث التضاعف بالأتجاهين.

4-1 ثباتية البلازميدات

من الصفات المعروفة للبلازميدات هي عدم الثباتية ، أذ يمكن فقدانها من المجتمعات البكتيرية بتكرار عالي ويختلف ذلك من بلازميد الى آخر. ان فقدان البلازميدات يمكن ان يسبب مشكلة في الصناعات بالنسبة للسلالات البكتيرية المهمة بالصناعة.

هناك ثلاث ظواهر مرتبطة مع فرضية ثباتية البلازميدات هي :

1) توجد التتابعات المتكررة (repeated sequences) التي تقود الى حذف او غرز ثم يحصل recombination بين التتابعات المتكررة ، على سبيل المثال يحصل حذف منطقة في البلازميد تحوي جينات مقاومة مضادات الكلورمفنيكول والكانامايسين، يلاحظ الحذف في اختبارات مقاومة المضادات الاخرى بتحديد حجم البلازميد، يمكن أن يبقى البلازميد بنفس الحجم وتعود له جميع صفاته المظهرية الأصلية، أحياناً يتغير تتابع قصير فقط في خريطة البلازميد.

2) حصول تجزؤ(partitioning) للبلازميدات أثناء أنقسام الخلية فقد يحصل توزيع عشوائي للبلازميدات بين الخلايا الجديدة (الناتجة عن الانقسام)، هناك أشكال من التراكيب المتعددة (Multimeric) خلال التضاعف. الشكل dimer يحوي أصلين للتضاعف. البلازميد ذو عدد نسخ 30 يمكن أن يوجد بـ 30 شكل أحادي monomers أو 15 dimer أو 10 من trimer . يحوي بلازميد Col E_1 موقع يعرف بـ *cer* يكون هدف لعمل بروتينات Xer D و Xer C ، في حالة dimer يكون هناك نسختين من تتابعات *cer* وتعمل بر وتينات Xer على حصول recombination بينهم تعمل بروتينات Xer D وXer C على حذف موقع *cer* من بلازميد Col E_1 وبالتالي لها دور في عدم الثباتية.

البلازميدات ذات النسخ القليلة لا تعتمد على التجزؤ العشوائي

يحوي بلازميد F أوبرون يدعى *ccd* يتألف من جينين هما *ccdB* و *ccdA* ، بروتين Ccd B يعد سام لأنه يتعارض مع تضاعف DNA (يؤثر في أنزيم DNA gyrase)، بينما يكون عمل بروتين Ccd A متضاد مع تأثير Ccd B.

في البلازميد ذو الانعزال الحر، يتحطم بروتين Ccd A بأنزيمات محللة للبروتين، بينما بروتين Ccd B يكون ثابت، يعمل على قتل الخلية (القتل بعد الانعزال) (Post-segregation killing)

تمتلك بعض البلازميدات ميكانيكية بديلة للقتل بعد الانعزال تعمل على تنظيم تعبير السم، بلازميد R_1 يحمل جين *hok* (host killing) يشفر لسلسلة متعدد الببتيد قصيرة سامة ويمتلك تأثيرات في غشاء الخلية، تثبط عملية ترجمة *hok* mRNA في الخلايا المحتوية بلازميد بواسطة جزيئة antisense RNA (*sok*) مكملة لمنطقة القائد (Leader sequence) لـ *hok* mRNA ، جزيئة *sok* RNA تتحطم سريعاً بينما تكون *hok* mRNA ثابتة جداً، في غياب *sok* RNA تتم ترجمة *hok* mRNA لينتج السم.

3) هناك أختلاف في سرعة نمو الخلايا التي تحمل البلازميد وتلك التي لاتحمل البلازميد اذ أن هناك عبأ (Load) أيضي من خلال تضاعف البلازميد وتعبير جيناته. معظم بلازميدات الطراز البري تكون صغيرة ويكون التأثير على سرعة النمو قليل، لكن البلازميدات المهندسة وراثياً تكون نسخها ذات عدد عالي جداً والتعبير بمستوى عالي جداً.

مدى المضيف

بعض البلازميدات مثل Col E_1 تكون قادرة على التضاعف في مدى ضيق من المضائف البكتيرية، البعض الآخر من البلازميدات تكون واسعة المضائف.

بلازميدات مجموعة P مثل Rp_4 قادرة على التضاعف في بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، أضافه الى معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام.

يتضاعف بلازميد Rp_4 في مدى واسع من البكتريا المضيفة إضافة لكونه قادر على تحفيز انتشاره عن طريق الاقتران بين الأنواع البكتيرية المختلفة. البلازميدات ذات المدى الواسع من المضائف لها أهمية كأدوات وراثية إضافة الى الدور الطبيعي في تسهيل انتقال الجين بين مدى واسع من الأنواع البكتيرية.

ثانيا) الجينات المتنقله Movable genes

هناك قطع من DNA في بدائية وحقيقية النواة لها القابلية على الانتقال من مكان الى أخر ضمن الجينوم (من كروموسوم الى بلازميد او بالعكس، من بلازميد الى اخر او ضمن الكروموسوم من مكان الى اخر) بعملية تدعى القفز Transposition ، هذه القطع من DNA تعرف بـ الجينات المتنقله (Movable genes) او العناصر القافزه (Transposable elements) .

1-2 تتابعات الأقحام Insersion sequences (IS)

تعد من أبسط انواع العناصر المتنقلة وتتالف من جين مفرد يشفر لأنزيم Transposase ، ويكون هذا الجين محصوراً (Flanked by) بتتابعات معكوسة (Inverted repeat) . على سبيل المثال اذا كانت تتابعات القواعد من اليسار A B C D E F فان التتابعات من اليمين هي :

F́ É D́ Ć B́ A ́

من الامثله عليها IS_1 و IS_2 التي توجد في كروموسوم بكتريا *E. coli* ولها نسخ على بلازميد F الذي يرتبط بالكروموسوم . يمكن ان تغرز نفسها في جين معين وبعد ان تنتقل تترك هذا الجين معطل فاذا كان هذا الجين مهم لصنع بروتينات مهمة للخلية او Operon فأنها سوف تتسبب في موت الخلية.

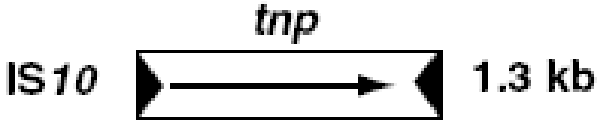
يتالف IS_1 من 768 قاعدة في الطول لكن بعضها أطول بحدود 1300 – 1500 قاعدة . تتألف تتابعات Inverted repeat من 23 قاعده.

يمتاز IS_{900} في بكتريا *Mycobacterium paratuberculosis* بعدم وجود Inverted repeat في نهايته.

تحتوي بكتريا *E.coli* على 6 نسخ من IS_1 اضافة الى نسخ IS الاخرى ، يختلف توزيع هذه IS على الكروموسوم من سلالة الى اخرى ، وهذا يظهر نسق مختلف من العزلات لنفس النوع.

كذلك توجد IS على البلازميدات البكتيرية ، مثالها بلازميد مقاومة مضادات الحيوية R-100 الذي يحمل نسختين من IS_1 ونسختين من تتابعات IS_{10} ، وان وجود IS يعد سبباً رئيسياً لعدم ثباتية البلازميدات، وهي تلعب دورا مهما في غرز البلازميد داخل الكروموسوم وحصول recombination بين بلازميدين ، وان وجود نسختين من عناصر IS في الكروموسوم ممكن ان تؤدي الى التأشب المتجانس (homologous recombination) وهي تلعب دور مهم في تغاير تركيب الجينوم بين سلاله واخرى.

بالرغم من أن تتابعات IS تؤثر في الطراز المظهري من خلال تسببها في أحداث الطفرات الاّ انها لا تحمل أي معلومات وراثية اخرى غير أنتاج أنزيم Transposase .



شكل 32: تتابعات الأقحام IS_{10}

2-2 القافزات Transposons :

عندما أكتشفت بلازميدات المقاومة لأول مره ، كان هناك تساؤلات عن قدرة بلازميد معين على حمل عدد مختلف من جينات المقاومة للمضادات وكيف للبلازميدات ذات العلاقة ان تاخذ نفس الجين . البلازميد الاساس له القابلية على التضاعف بصورة مستقله ويلتقط جينات المقاومة من الكروموسوم في السلاله المقاومة المضيفه له، وهو يتحرك وينتقل من كائن الى أخر ليكسبه جينات مقاومة أضافية، عندما يلتقط البلازميد نفس الجين بصورة مستقله يوضح الانتشار الواسع لجينات المقاومة ، على سبيل المثال يوجد الجين المشفر لأنزيم البيتالاكتاميز نوع TEM في بكتريا *Pseudomonas* ، والجين نفسه موجود في بكتريا *Neisseria* و *Haemophilus influnzae* السبب في ذلك اصبح معروفاً عند اكتشاف هذا الجين القافز الذي يستطيع الحركة من بلازميد الى اخر.

القافزات المركبة Composite transposons :

يتألف هذا النوع من القافزات من منطقة وسطية مركزية (Central region) تكون محصورة (flanked by) باثنين من IS على الجانبين، ويوجد في المنطقة الوسطية جينات

تشفر لمقاومة بعض مضادات الحياه وانتاج بعض السموم. من أمثلتها Tn_5 وهو بحدود 5700 زوج قاعده يكون محصور بـ IS_{50} ويحمل جين مقاومة الكانامايسين . أما Tn_9 فيكون بحدود 2500 زوج قاعده ويكون محصور بـ IS_1. ويكون Tn_{10} بحدود 9300 زوج قاعده ومحصور بـ IS_{10} (بحدود 130 زوج قاعده) ، وفي نهايته (أي نهاية IS) يوجد Inverted repeat بحدود 23 زوج قاعده وهي تحوي Transposase gene ، كما تحمل جين مقاومة التتراسايكلين . Tn_5 و Tn_{10} يمكن ان تملك inverted repeat او direct repeat في IS بينما Tn_9 يمتلك direct repeat .

شكل 33 : القافز المركب Tn_{10}.

القافزات نوع Tn3 :

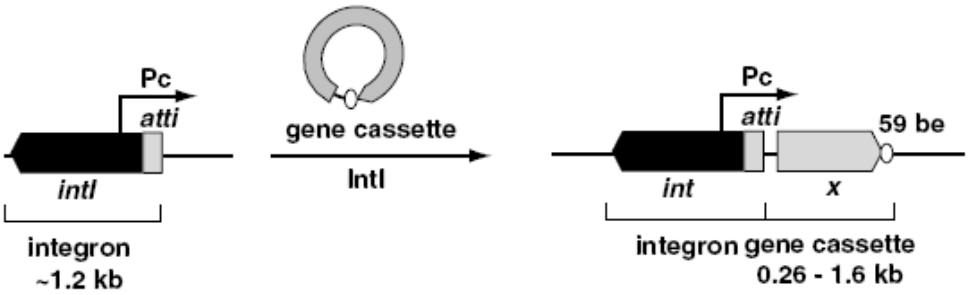
مثالها Tn_{501} و Tn_3 ، القافز (الترانزبوزن) البسيط Tn_3 يتألف من 5000 زوج قاعده ويحصر بتتابع direct repeat من 38 زوج قاعده في كل نهايه. توجد في المنطقة الوسطية ثلاث جينات هي Transposase gene (*tnpA*) وجين يشفر لبروتين Tnp R وهو بروتين ثنائي الوظيفه يعمل كمثبط ومسؤول عن مرحلة resolution ضمن عملية القفز Transposition وجين *bla* المسؤول عن مقاومة مضاد الامبسلين.Tn_{501} يكون بحدود 5000 زوج قاعده ويحصر بـ 38 زوج قاعده من direct repeat ويحمل جين مقاومة الزئبق.

شكل 34: القافز نوع Tn3.

2- 3 الأنتكرونات Integrons

عناصر جينية قادره على دمج او تحريك حوافظ جينية (gene cassettes) بعملية اعادة الاتحاد بوجود انزيم DNA integrase وتحوي جينات مقاومة مضادات الحيوية.

بعض الترانزبوزونات الكبيرة مثل Tn_{21} تمتلك تركيب مشابه لترانزبوزون Tn_3 وهي تمتلك Inverted repeat بحدود 38 زوج قاعدة في كل نهاية وتحمل جينات مهمة لعملية القفز Transposition.



شكل 35: الأنتكرونات.

تطور Tn_{21} من ترانزبوزون صغير هو Tn_{2613} ثم أكتسب جينات اضافية بميكانيكيات متخصصة ، ينغرز كل جين مفرد كحافظة جينية (gene cassette) والذي يحتوي جين مفرد وموقع recombination.

يحوي Tn_{21} منطقة تعرف integron وهي تحتوي جين يشفر لأنزيم Integrase المسؤول عن موقع متخصص للتأشب (recombination) . لا يوجد integron في عائلة Tn_{21} فقط انما هناك عدة أصناف من الأنتكرون موجودة في ترانزبوزونات أخرى أضافة الى البلازميدات التي لا تحمل ترانزبوزونات.

وجد ان أنزيم البيتالاكتاميز IMP-1 المنتج من بكتريا *Ps. aeruginosa* يشفر له من قبل جين متحرك موجود على انتكرون له القابلية على الأنتقال بين الممرضات.

2-4 القفز Transposition :

تتحرك الترانزبوزونات مثل Tn_3 بواسطة ميكانيكية تضاعف (replicative) أذ تنتقل نسخة من الجين القافز الى موقع على الكروموسوم أو البلازميد بينما تبقى النسخة الاصلية بمكانها. يكون الموقع الجديد او موقع الهدف أكثر عشوائية بالنسبة لبعض الترانزبوزون أي لا يحتاج تتابع متخصص ، بينما يحتاج ترانزبوزون اخر الى تتابع متخصص اكثر كموقع هدف مثل Tn_7 الذي يملك موقع هدف واحد فقط في كروموسوم *E. coli* . تحصل عملية القفز Transposition بين بلازميدين لتكوين بلازميد كبير Co- integrate يتالف من تتابع كامل من كلا البلازميدين لكن يملك نسختين من الترانزبوزون في نفس الاتجاه.

عندما ينفصل البلازميدين يحوي كل منهما نسخه من الترانزبوزون.

تملك بعض الترانزبوزونات من ضمنها Tn_3 جيـــن *tnpR* يشفر بأنزيم resolvase الذي يتواسط التأشب المتخصص في موقع resolution بالترانزبوزون.

يحتوي البلازميد Co-integrate نسختين من الترانزبوزون في نفس الاتجاه direct repeat، ويعطي التأشب بين النسختين النواتج النهائية لعملية القفز Transposition.

لا تظهر جميع الترانزبوزونات نفس السلوك، بعض IS لاتتضاعف عندما تتحرك ، هذا النموذج من Transpsition يدعى المحافظ (Conservative) او Non-replicative يلاحظ ذلك مع Tn_{10} و IS_{10} وفي هذه الحالة يحصل قطع ولصق، يقطع الترانزبوزون بالكامل من الجزيئة المانحه قبل لصقها الى موقع الهدف.

تحوي بعض IS مثل IS_{10} على حفاز (Promoter).

تلعب الترانزبوزونات دوراً رئيسياً في تطور البلازميدات المقاومة لمضادات الحيوية بتحفيز حركة الجينات المسؤولة بين مختلف البلازميدات او من الكروموسوم في الكائن المقاوم الى البلازميد.

ثالثا) الأنتقال الأفقي للجينات Horizental Genes Transfer

1-3 الأقتران البكتيري Bacterial Conjugation

هي عملية انتقال الجينات من الخلية الواهبة (المانحة) الذكرية الى الخلية المستلمة (الانثوية) عن طريق جسر سايتوبلازمي يتكون بين الخليتين اثناء الاقتران ، درست في البداية عملية الاقتران بنجاح سنة 1946 من قبل تاتم وليدربرك على بكتريا *E.coli* K12 .

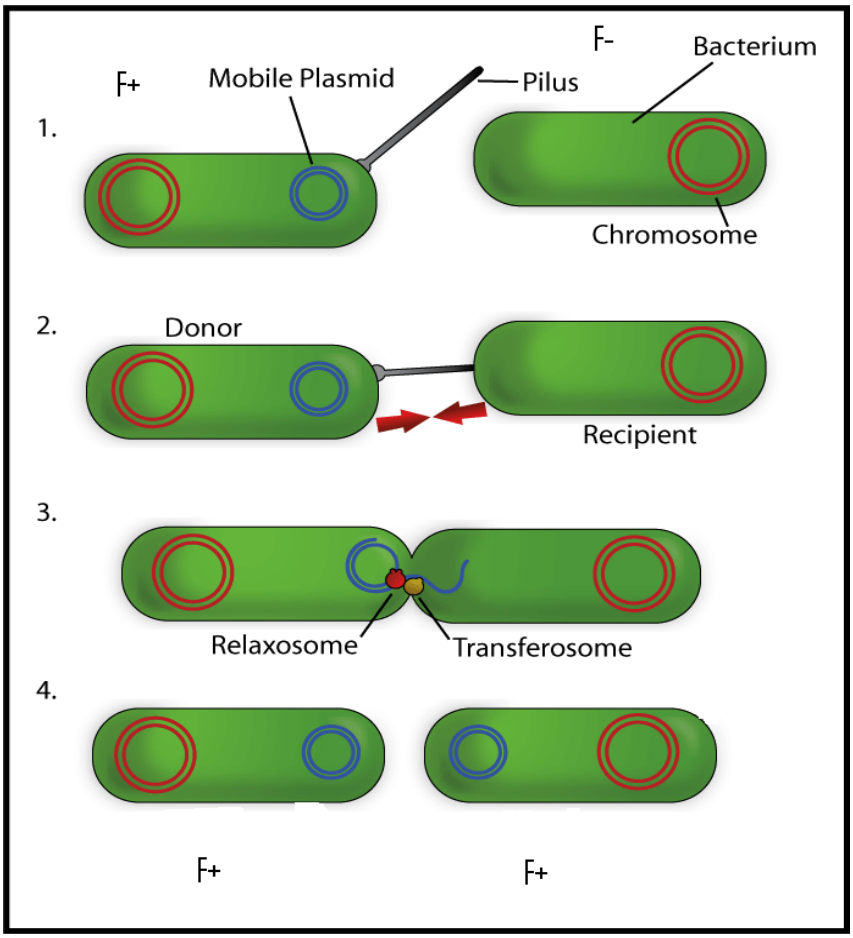
ميكانيكية أنتقال الجينات أثناء الاقتران:

تنجذب الخلايا ألانثوية نحو الخلايا الذكرية وتتكون أزواج من الخلايا ، وتتطلب عملية الاقتران وجود أنبوبة التزاوج (sex pilus) على سطح الخلايا الذكرية وهي لاحقة شعرية مجوفة مسؤول عن تكوينها جينات على بلازميد F او بلازميد R فتدعى F-Pili او R-Pili حسب البلازميد المسؤول عنها.

بعد تكون جسر الاقتران يتحفز البلازميد F ويتهيأ للانتقال حيث يحصل قطع في احد الشريطين ويبدأ احد الشريطين بالتوجه نحو جسر الاقتران للعبور الى الخلية المستلمة وهنا تبدأ عملية تضاعف البلازميد في الخلية المانحة التي اصبحت تحوي على نسخة واحدة من بلازميد F. يتضاعف البلازميد بطريقة الدائرة المتدحرجة (Rolling Circle).

يمكن تلخيص مراحل او خطوات عملية انتقال البلازميد بعملية الاقتران البكتيري كالأتي:

1) حدوث تماس بين الخلايا المانحة (Donor Cells) والخلايا المستلمة(Recipient Cells).
2) تهيئة البلازميد للأنتقال (هناك بلازميدات تستطيع تهيئة نفسها للأنتقال تدعى بلازميدات متحركة (mobilizable plasmids).
3) انتقال نسخة او شريط مفرد للبلازميد الى الخلية المستلمة وبقاء شريط في الخلية المانحة .
4) تضاعف نسخة البلازميد في كلا الخليتين المانحة والمستلمة.



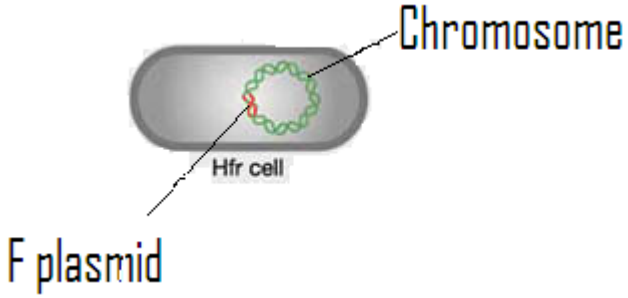
شكل 36: خطوات الأقتران البكتيري في البكتريا السالبة لصبغة كرام.

بعد دخول شريط بلازميد F الى الخلية المستلمة يبدا بالتضاعف ليصبح جزيئة مزدوجة وهنا ستتحول الخلية المستلمة الى خلية F^+ لها القدرة على التزاوج مع خلايا F^- وتبقى الخلية الاصلية F^+ ذكرية بعد تضاعف البلازميد فيها ورجوعه جزيئة مزدوجة الشريط. قد يبقى

البلازميد المنتقل حرا في سايتوبلازم الخلية المستلمة او يرتبط مع الكروموسوم بشكل Episome ليكون خلايا Hfr (High Frequency recombination) وهي خلايا ذكرية عالية الخصوبة قادرة على الاقتران.

خلايا Hfr

يكون بلازميد F في خلايا Hfr مرتبط مع الكروموسوم ويتم هذا الارتباط في اماكن عديدة على الكروموسوم، فهناك مواقع متماثلة (homologous) بين بلازميد F ومواقع معينة على الكروموسوم ودائما هناك خلايا Hfr مختلفة فيما بينها حسب مواقع ارتباط بلازميد F بالكروموسوم اي في كل موقع ارتباط تنشأ Hfr مختلفة عن الاخرى. تكون خلايا Hfr ذكرية وبسبب التردد العالي لأنتقال الجينات الكروموسومية لخلية Hfr سميت هذه الخلايا بالعالية الخصوبة، وفيها لا ينتقل فقط البلازميد الى الخلايا المستلمة بل تنقل جينات كروموسومية ايضا.



شكل 37: خلية Hfr الناتجة عن أرتباط بلازميد F مع الكروموسوم .

عند حصول أقتران بين خلية Hfr مع خلية F^- يتكون جسر اقتران ويتحفز بلازميد F للانتقال أذ يحصل قطع في أحد الشريطين ويبدأ بالتحرك نحو جسر الاقتران وهنا يسحب معه جزء من كروموسوم الخلية Hfr الى الخلية المستلمة وبالتالي تحصل الخلية المستلمة على شريط من بلازميد F حامل معه جينات كروموسومية. تنتقل جينات الكروموسوم مع البلازميد F بالتسلسل حسب موقع الكسر او نقطة الكسر وتعبر الجينات القريبة من نقطة الكسر اولا ثم تليها الجينات الابعد وهكذا ، ويبقى جزء من بلازميد F داخل الخلية المانحة هو الذي ينتقل في نهاية الكروموسوم. اي ان بلازميد F لا ينتقل بأكمله الا بعد اكمال نقل شريط كامل من الكروموسوم وهذا نادر الحصول أذ يتطلب وقت أطول (يستغرق نقل الكروموسوم بأكمله حوالي مائة دقيقة) لكن في الطبيعة يمكن ان ينتهي الاقتران في اي وقت وينكسر جسر الاقتران وتبقى عندها الخلية المستلمة F^- لأنها لم تتسلم عامل F بأكمله . ولن تتحول الخلايا المستلمة الى خلايا F^+ الا في حالة بقاء الاقتران الى الوقت الذي يسمح بانتقال جميع جينات الكروموسوم ثم انتقال عامل F بأكمله.

يحدث احيانا أنفصال عامل F المرتبط مع الكروموسوم وعند حدوث خطأ في الانفصال بحيث ترتبط قطعة صغيرة من الكروموسوم مع بلازميد F عند انفصاله ينتج عن ذلك تكون خلايا $F^{/}$ وهي خلايا ذكرية عند اقترانها مع خلايا سالبة تتحول الى F^{+} وهي تختلف عن خلايا F^{+} من حيث ان جينات كروموسوم الخلية الواهبة $F^{/}$ الملتصقة مع عامل الخصوبة F تؤدي الى أزدواج بعض الجينات في الخلية المستلمة اي تزدوج بعض الجينات (Partially diploid) وتدعى العملية ب Sexduction : نقل جينات من كروموسوم الخلية الواهبة عن طريق بلازميد $F^{/}$ الى الخلية المستلمة

تستطيع بعض البلازميدات ان تنتقل من خلية بكتيرية الى اخرى بالاعتماد على نفسها بينما لا تستطيع بلازميدات اخرى من الانتقال الا بمساعدة بلازميدات اخرى ، اذا كان البلازميد يحمل جينات مسؤولة عن تكوين جسر الاقتران فهو بلازميد اقتراني (conjugative plasmid) ، اما البلازميد الذي لا يحمل هذه الجينات فهو غير اقتراني (non-conjugative plasmid) وبالتالي لا يستطيع الانتقال الى الخلايا المستلمة. عندما يكون البلازميد اقتراني (يستطيع تكوين جسر الاقتران) ومتحرك بنفس الوقت اي يستطيع ان يتضاعف وينتقل عندها يكون بلازميد ذاتي الانتقال (Self-transmissible plasmid) (أقتراني ومتحرك بالوقت نفسه) مثل بلازميد F وبلازميد R. اما اذا كان البلازميد غير أقتراني (لا يستطيع تكوين جسر الاقتران) لكنه متحرك فهو ينتقل الى الخلايا المستلمة فقط عند وجود بلازميد اقتراني معه في نفس الخلية بعملية تدعى (donation) مثل بلازميد Col E1.

يمكن أن يكون البلازميد غير اقتراني وغير متحرك بنفس الوقت وهنا لا يستطيع الانتقال بذاته الا بوجود بلازميد يتحد معه بعملية تدعى Conduction.

تاتي أهمية البلازميدات المنتقلة ذاتيا والاقترانية من الناحية الوبائية كونها تساعد في الانتشار السريع لجينات مقاومة مضادات الحيوية بين الاجناس والعوائل البكتيرية المختلفة .

بدأ ظهور السلالات البكتيرية الحاملة لبلازميد المقاومة R بكثرة بعد شيوع أستعمال مضادات الحيوية علما أن هذه البلازميدات كانت موجودة قبل اكتشاف مضادات الحيوية لكن بأعداد قليلة نسبيا مقارنة بالوقت الحاضر ، وجد ان هناك علاقة طردية بين كمية المضادات الحيوية المستعملة في المستشفيات وبين أعداد البكتريا الحاملة لبلازميد R الموجودة في مجاري تلك المستشفيات ، وعزلت هذه السلالات من الحيوانات الاليفة ومزارع الاسماك المعاملة بتراكيز عالية من مضادات الحيوية.

الاقتران البكتيري في البكتريا الموجبة لصبغة كرام

يحصل الأقتران البكتيري (Conjugation) بين الاجناس البكتيرية التابعة للعائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) والاجناس التابعة لبقية البكتريا السالبة لصبغة كرام (مثل مجاميع Vibrios و Pseudomonads) عن طريق pili الموجودة على سطح الخلايا المانحة ، هذه pili مختلفة بالتركيب فهناك الطويلة الرقيقة (thin) وهناك pilus القصيرة والصلبة (rigid).

كذلك يحصل الاقتران بين بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل الانواع التابعة لبكتريا *Streptomyces* المهمة في أنتاج مضادات الحيوية ، وأنواع بكتريا *Streptococcus* التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك المهمة في صناعة الالبان وبكتريا *Enterococcus faecalis* المهمة من الناحية الطبية .

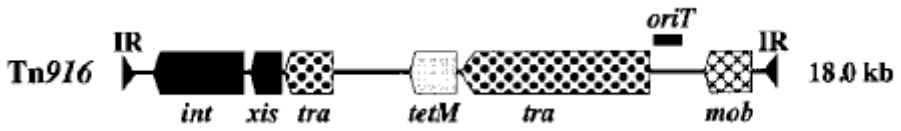
تمتلك هذه البكتريا بلازميدات لها القابلية للأنتقال عن طريق الاقتران لكن بميكانيكية تختلف الى حد ما مع ميكانيكية الاقتران بين البكتريا السالبة لصبغة كرام، كذلك تكون عدد الجينات المطلوبة لعملية الاقتران في البكتريا السالبة 20 جين أو أكثر قليلا اما في الموجبة فتكون 5 جين وتكون البلازميدات الاقترانية في البكتريا الموجبة لصبغة كرام صغيرة الحجم. وان احد اسباب قلة عدد الجينات في البكتريا الموجبة لصبغة كرام كون ميكانيكية الاقتران فيها لا تحتاج الى تكوين pilus.

تم دراسة الاقتران بالتفصيل في بكتريا *Enterococcus faecalis* من بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، أذ تنتج بعض سلالاتها مواد ببتيدية لها تاثير شبيه بالفرمونات تعمل على تحفيز التعبير الجيني لجينات *tra* المسؤولة عن الاقتران والموجودة على البلازميد الاقتراني.

تفرز الخلايا المستلمة الانثوية الفرمونات، وتكون هناك مستقبلات للفرمونات على سطح الخلايا المانحة الذكرية ، يكون المسؤول عن هذه المستقبلات هي البلازميدات في الخلايا المانحة. تنتج الخلايا المستلمة مدى واسع من هذه الفرمونات لتمكنها من التزاوج (mating) مع الخلايا المانحة التي تحمل البلازميدات.

بعد ان يرتبط الفرمون بالمستقبل الموجود على سطح الخلايا المانحة يتم نقله الى السايتوبلازم بوساطة بروتينات خاصة بعدها ترتبط ببروتين داخل الخلية يدعى Tra A والذي يعمل كمثبط لجينات *tra* المهمة للأقتران والموجودة على البلازميد وبالتالي فان ارتباط الببتيدات الداخلة للخلية مع الكابح Tra A سيعمل على فسح المجال لجينات *tra* بالعمل لحصول الاقتران.

من جانب آخر لوحظ وجود القافزات(الترانزبوزونات) الاقترانية (Conjugative Transposons) (CTn) في البكتريا الموجبة لصبغة كرام ومثال على ذلك وجد القافز Tn*916* في بكتريا *E. faecalis* والمعروف ان الجين القافز له القابلية على الانتقال من مكان الى آخر ضمن الجينوم . الذي يميز القافز Tn*916* عن غيره كون له القابلية على الانتقال من خلية الى اخرى عن طريق الاقتران البكتيري ، وهو يختلف عن البلازميدات من ناحية التضاعف واعتماد ذلك على تضاعف الكروموسوم، اما من ناحية طريقة الانتقال الى الخلايا الاخرى فهي تشبه الى حد كبير أنتقال البلازميدات.



شكل 38 : القافز الأقتراني Tn*916*.

لا توجد تسمية محددة لهذه العناصر المتنقلة وقد تسمى بالعناصر الأقترانية الملتحمة Integrating Conjugative Elements (ICE) ويدعى الأنزيم الذي يساعد في عملية ألتحام هذه العناصر بأنزيم CTn Integrase ويكون ذا علاقة مع بعض عاثيات لمبدا.

ينتقل القافز الاقتراني Tn*916* أثناء الأقتران بين الخليتين ،أذ ينفصل اولا عن الكروموسوم عن طريق انزيمات قاطعة يشفر لها Tn*916* ثم يصبح دائري بعدها يتحفز للانتقال ثم يبدأ أنتقال شريط مفرد عن طريق Ori T (نقطة الاصل) ويدخل للخلية المستلمة ويصبح دائريا مرة أخرى وبعدها يتم بناء الشريط المكمل ثم يلتحم بكروموسوم الخلية المستلمة.

يكون القافز Tn*916* منتشر بشكل واسع بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام الكروية (G + ve Cocci) لقابليته على الانتقال بالاقتران بين مختلف الانواع البكتيرية، وتلعب الجينات القافزة الاقترانية دورا مهما في نشر جينات المقاومة لمضادات الحيوية مثل جين مقاومة التتراسايكلين (*tetM*) الموجود بشكل واسع بين الانواع البكتيرية المختلفة. الجدير بالذكر ان القافزات الاقترانية توجد كذلك ضمن البكتريا السالبة لصبغة كرام.

2-3 التحول البكتيري Bacterial Transformation

تتضمن ميكانيكية التحول البكتيري أنتقال المعلومات الوراثية من خلال قطعة DNA من السلالة المانحه الى السلالة المستلمه وبالتالي ظهور صفات جديدة تتوارثها الخلايا المستلمة ، وتختلف عملية التحول عن الاقتران بانها لاتحتاج الى تماس مباشر بين الخلايا المانحه والمستلمة.

أكتشفت ظاهرة التحول في بكتريا ذات الرئة *Streptococcus pneumoniae* من قبل Griffith سنة 1920 عندما لاحظ أمكانية تحويل الشكل الخشن (R) لمستعمرات هذه البكتريا الى الشكل الناعم (S) داخل الجسم الحي واعتقد في حينها انه لا بد من وجود عامل مسؤول عن ذلك سمي عامل التحول (Transformation agent).

أثبتت الابحاث بعد ذلك ان عامل التحول هو DNA مما اعطى دليلاً على ان DNA هو المادة الوراثية.

لا يحدث التحول في جميع الانواع البكتيرية بسهولة، وتسمى الخلايا المستقبله التي تسمح بدخول DNA بالخلايا الكفوءة (Competent cells) أي المؤهلة فسيولوجياً على تقبل DNA الخارجي ، من الأمثلة على البكتريا القابلة للتحول *Bacillus subtilis* و *Haemophilus influenzae* و *Rhizobium ssp* و *E. coil* و *Streptococcus pneumoniae* ، وتكون الخلايا عادة مؤهلة في نهاية الطور اللوغارتمي (Log phase) من أطوار النمو وفي بداية دخول طور الثبوت (Stationary phase) وهذا يعود أستجابة لأزدحام الخلايا، على سبيل المثال في بكتريا *B.subtilis* فان بعض الجينات التي تدخل في التأهيل تدخل كذلك في المراحل المبكرة لتكوين السبورات Sporulation . لا يرتبط تطور التأهيل في هذا الطور مع نفاذ المغذيات فقط أنما يرتبط كذلك مع تراكم نواتج معينة (competence factors عوامل التأهل) التي تعمل على تحفيز تعبير جينات اخرى ضرورية للتاهل ومستوى هذه العوامل يعتمد على تركيز الخلايا، التاهل يتطور فقط في حالة وجود كثافة عالية للخلايا وهو مرتبط بتحسس الزحام (quorum sensing).

يمكن تحويل الخلايا غير المؤهلة الى مؤهلة في المختبر بمعاملتها بما يسمى بصدمة الكالسيوم وهي عملية حضن الخلايا لمدة طويلة في محلول كلوريد الكالسيوم ، او معاملة الخلايا بمركب Dimethyl sulfoxide (DMSO) أو أضافة متعدد الايثلين glycol polyethylene للتخفيف من الشحنات السالبة على سطوح الخلايا، او حثها بالتعريض لنبضات عالية الفولتية (تثقيب كهربائي Electroporation) لكن مع هذا فهناك سلالات مهمة من الناحية الصناعية والبيئية والسريرية لايمكن تحويلها الى خلايا مؤهلة ، اما الخلايا المؤهلة طبيعيا مثل أجناس *Neissera* و *Haemophilus* وغيرها فيعتمد التقاطها

لجزيئة DNA على وجود تتابعات قصـيرة من النيوكليوتيدات في DNA ، وهي تلتقط DNA من نفس النوع بكفاءة.

مراحل حدوث عملية التحول:

1- مرحلة أرتباط DNA: يتم فيها أرتباط قطعة DNA السلاله المانحة مع جدار الخلية الكفوءه والتي يحتوي سطحها على مستقبلات خاصة تساهم في أرتباط DNA مع جدار هذه الخلايا، ويوجد عدد محدد من المستقبلات لذلك تتنافس قطع DNA فيما بينها للارتباط مع هذه المستقبلات.

يتم بعدها تجزئة DNA السلاله المانحه بواسطة انزيم endonuclease من الخلية المستلمة ويبقى DNA مزدوج.

تقوم الخلايا المؤهلة بافراز بروتين Competence factor لكي تكون قادره على استقبال قطعة DNA من الخلية الواهبه.

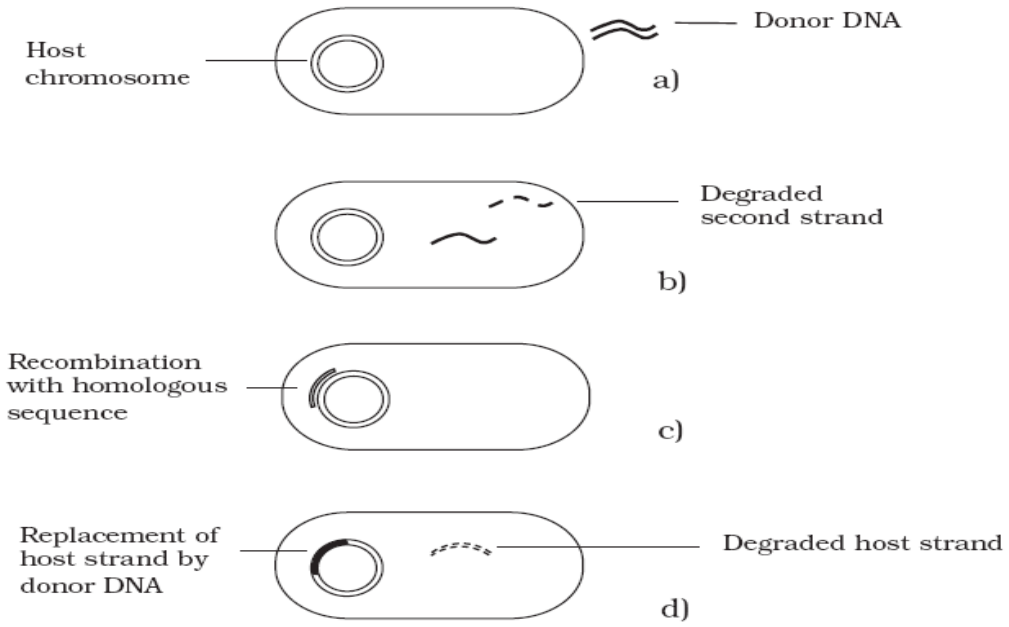
2- مرحله دخول DNA الى الخلية المستلمة: أذ تدخل قطعة DNA بشكل خيط مفرد (Single Strand) وهذه العملية تحتاج طاقة لكي تستطيع قطعة DNA من عبور غشاء الخلية والوصول الى السايتوبلازم.

3- بعد دخول قطعة DNA تبدأ بتحديد موقع وراثي مماثل لها على كروموسوم الخلية المستلمة، بعدها يحصل تبادل وراثي بين DNA الخلية المانحة و DNA الخلية المستلمة وبذلك يصبح كروموسوم الخلية المستلمة حاويا على الصفات الوراثية للخلية المانحة.

من الامثلة على أنتقال صفات جديدة الى الخلايا المستلمة بميكانيكية التحول ، هو تطور المقاومة لمضادات الحيوية في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* والذي يحدث باستبدال جزء من الجينات المشفرة لأنزيمات الهدف لمضاد البنسلين بجزيئة DNA المماثل من بكتريا *Streptococcus* الموجودة في الفم والمقاومة بصوره طبيعيه لهذا المضاد.

تحصل في بكتريا السيلان *N. gonorrhoeae* تغايرات مستضدية (Antigenic Variation) عن طريق انتقال جينات *Pil* المشفرة للوحدات الثانوية للبروتين الرئيسي للـ Pili التي تلتصق من خلالها البكتريا الى الخلايا الطلائية.

تستطيع بعض الخلايا المؤهلة من التقاط جينوم كامل لبعض العاثيات بظاهرة تدعى Transfection .



شكل 39 : مراحل عملية التحول (a- مرحلة أرتباط DNA b- مرحلة دخول DNA الى الخلية المستلمة C – أرتباط DNA الخلية المانحة مع DNA الخلية المستلمة d – حصول تبادل وراثي بين DNA الخلية المانحة و DNA الخلية المستلمة)

3-3 Transduction (التوصيل ، التنبيغ ،التأبير)

عملية نقل قطعة DNA من خلية بكتيرية (مانحة) الى خلية بكتيرية مستلمة بواسطة العاثي (Bacteriophage) وبالتالي نقل معلومات وراثية (صفات جديدة) الى الخلية المستلمه.

يحمل العاثي قطعة DNA من أحدى الخلايا البكتيرية داخل غلافه البروتيني وبما ان العاثي لـه القدرة على زرق DNA الى بكتريا اخرى فان قطعة DNA هذه سوف تنتقل الى الخلية المستلمة.

المعروف ان ليس لجميع العاثيات القدرة على نقل المعلومات الوراثية، اذ يتطلب من العاثي الذي يصيب الخلية البكتيرية ان يحقق أصابة ويحصل تكسير DNA الكروموسومي للخلية المستلمة لتكوين قطع بحجم ملائم ويتم تعبئة جزء من الكروموسوم بالوقت المناسب.

هناك نوعان من النقل بواسطة العاثي:

1- العام (غير المتخصص) Generalized transduction

2- الخاص (المتخصص) Specialized transduction

بالنسبة للأول (العام) يقوم العاثي بنقل أي قطعة DNA من كروموسوم الخلية البكتيرية المانحة بدون تخصص ، بعد ان يصيب العاثي الخلية البكتيرية يحصل تعبئة DNA (Packaging of DNA) داخل رأس العاثي، وهذه الجسيمات تدعى Transducing particles بعد تحررها تقوم بأصابة خلية بكتيرية أخرى (مستلمة). أذ ان المعلومات الضرورية لالتصاق العاثي وحقن DNA موجوده على بروتينات جسيمه العاثي.

يتم حقن (زرق) DNA الى داخل الخلية المستلمة وهنا يمكن ان تتحد قطعة DNA مع كروموسوم الخلية البكتيرية الجديده وبالتالي يتم نقل الجينات من خلية بكتيرية الى اخرى بواسطه العاثي.

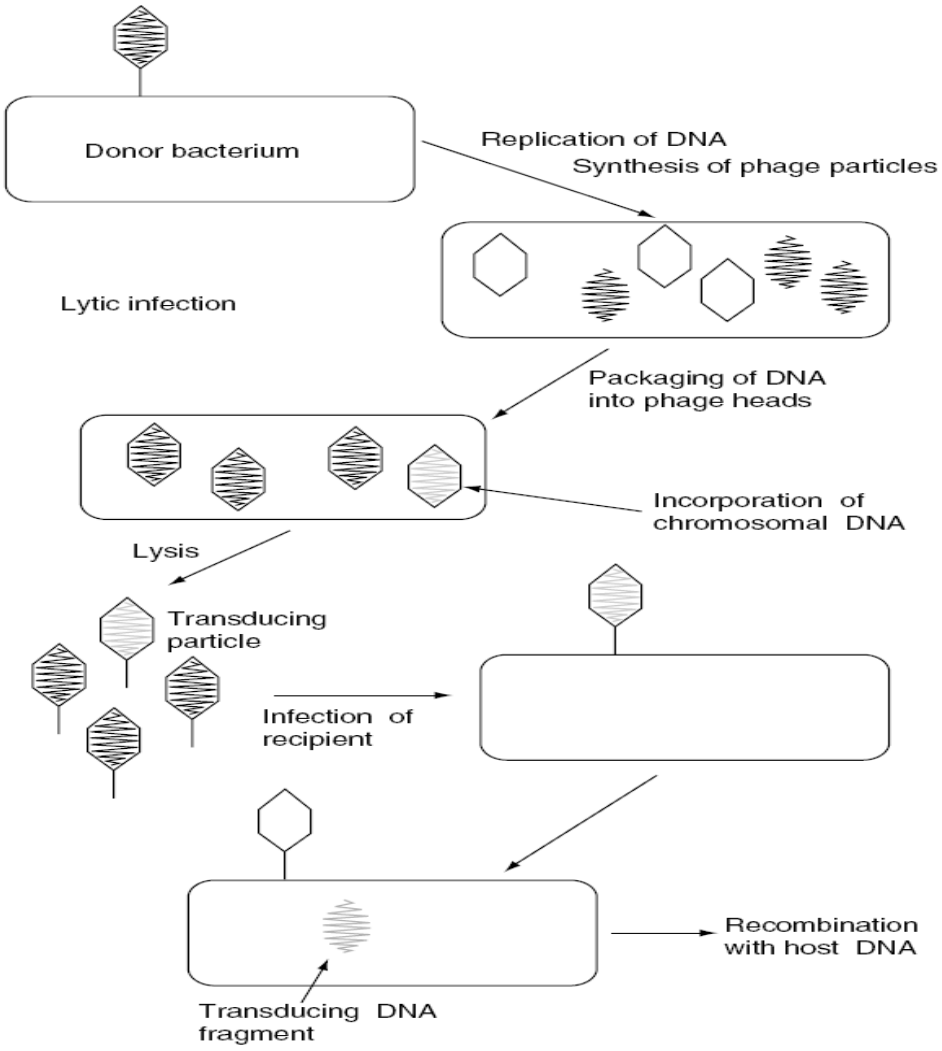
يكون DNA المنقول بالعاثي في بعض الاحيان عبارة عن بلازميد بكتيري عند زرقه فانه يستطيع التضاعف والتوارث في الخلية المستلمة، بينما لا تتمكن بعض قطع DNA الكروموسومي المنقوله (Tarnsducing DNA) من التضاعف والتوارث لان هذا الامر يتطلب homologous recombination مع DNA الكروموسومي للخلية المستلمة.

اما في حالة النقل او التوصيل المتخصص فان العاثي يقوم بنقل جزء محدد متخصص من كروموسوم الخلية المانحه، وهنا يقتصر الامر على نقل صفات محددة من الخلية المانحة ، يعود سبب ذلك الى ارتباط العاثي بموقع محدد لايتغير على كروموسوم الخلية البكتيرية المانحة، اذ ان temperate phages تندمج مع كروموسوم الخلية البكتيرية بحالة Lysogeny أذ يكون العاثي خامل prophage، وتكون جينات العاثي وتضاعف العاثي مثبطة او مكبوحة (repressed).

يمكن ان يعود العاثي الى حالة Lytic cycle وتنتهي حالة Lysogeny وبالتالي ينفصل عن كروموسوم البكتريا أذ يحصل recombination بين كروموسوم العاثي وكروموسوم البكتريا.

عند حصول recombination بشكل خاطىء وأخذ العاثي جزء من كروموسوم البكتريا معه اثناء انفصاله فان هذا التوصيل يقوم بنقل عدد محدد من الجينات (وهي تشبة ظاهرة F' plasmid). أكتشف التوصيل المتخصص عند دراسة العاثي λ (Lambda) في بكتريا *E. coil* K_{12}

وفي عاثي Mu وجد انه ينغرز في عدة مناطق في الكروموسوم بميكانيكية تشبة الجينات القافزه (Transposons) وهو يستعمل في دراسات التطفير ورسم الخرائط الجينية. يختلف التوصيل عن التحول بكون DNA هنا لا يتعرض للبيئات الخارجية أنما يتم داخل الانظمة الحيه (*in vivo*).



شكل 40: مراحل عملية التوصيل (التنبيغ)

التأشب (Recombination)

هي عمليات أعادة ترتيب المواد الوراثية في الخلايا المستلمة للمواد الوراثية القادمة من الخلايا الواهبه لانتاج جينومات جديدة وتحدث أيضا أثناء عملية أصلاح الاضرار في DNA وتشمل كذلك كسر وربط جزيئات DNA الابويه لتكوين جزيئات هجينه.

تحتاج الى أنزيمات قاطعة endonucleases او exonucleases وأنزيمات بلمره DNA polymerases وأنزيمات رابطه Ligases . كذلك تحتاج الى بروتين Rec A الناتج من جين *recA*.

أنواعه :

- General (homologous) recombination: التأشب العام المتجانس

* Site-specific (non-homologous) recombination: التأشب المتخصص وغير المتجانس

يشمل التأشب العام ربط قطع DNA من الخلايا الواهبه والخلايا المستلمه الحاويه على تتابعات قواعد متجانسة (Homologous) وهنا يكون بروتين RecA هو الاساس أضافة الى نواتج جينات اخرى. ويتطلب درجات من التجانس بين قطعتي DNA وهو يحصل بين أي قطعتين من homologous DNA.

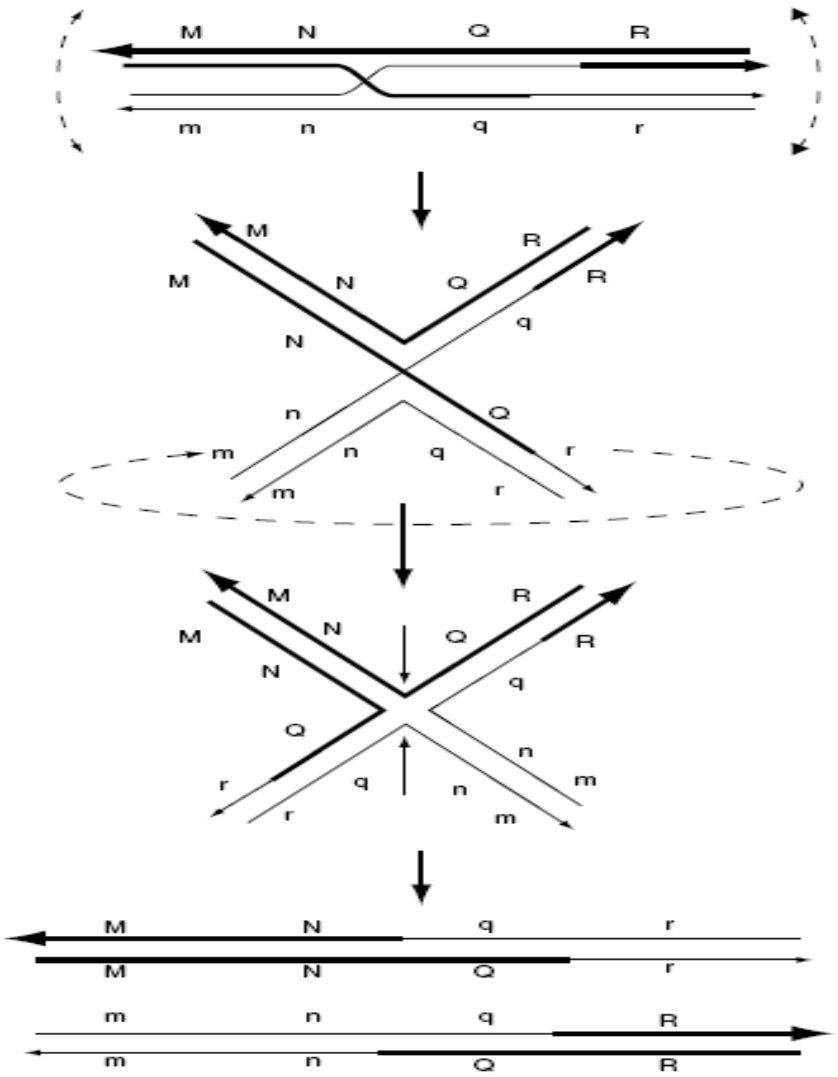
يحفز بروتين RecA التداخل بين جزيئات DNA المتأشبه ويلعب دورا في البلمره على أشرطة DNA لتكوين خيوط حلزونية منتظمة.

هناك بروتين Rec BCD ناتج جينات *recB* و *recC* و *recD* وهو أنزيم متعدد الوظيفه (exonuclease و endonuclease) ، يلعب دور في فك جزيئات DNA لتوفير منطقة أشرطة مفرده ، احد الاشرطة يتم كسره في موقع متخصص يدعى موقع chi(x) وهي مواقع ساخنه تكثر فيها حصول recombination ، هذه التتابعات في بكتريا *E. coli* هي :

5َ¯ G C T G G T G G 3¯

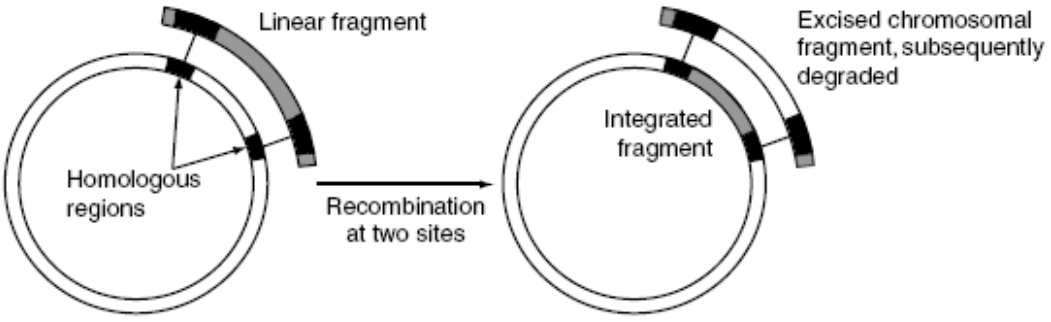
النموذج المبسط لحصول التأشب العام هو أزدواج قطعتي DNA في مناطق متجانسه ثم حصول قطع على أحد الاشرطة ثم استبداله بجزء من الشريط الثاني فينتج عن ذلك شكل وسط بين الجزيئتين تتمثل بتكوين جزيئة DNA هجينه من جزيئتي DNA. هذا التركيب يمكن ان يكون بشكل حرف X بعدها تحصل دوران بدرجة (180˚)

يتكون بشكل يدعى Holliday Junction (نسبة لأسم العالم Robin Holliday)



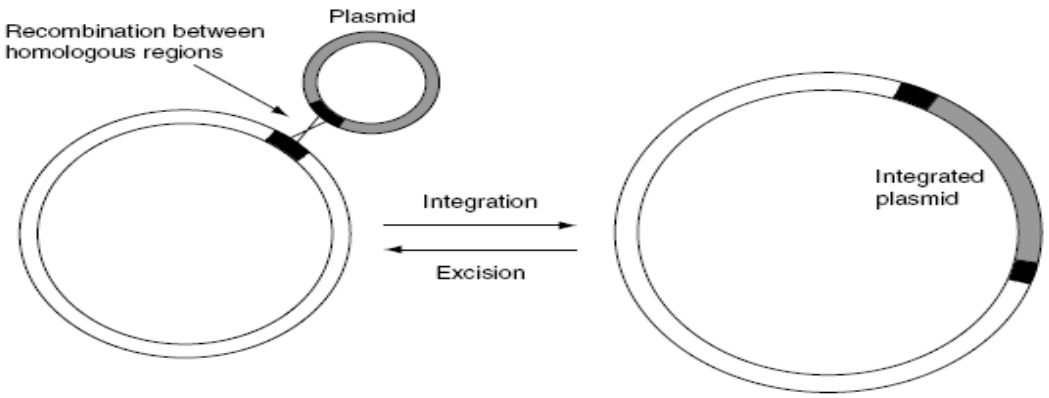
شكل 41 : النموذج المبسط لحصول التأشب العام.

ويمكن ان يحصل recombination بين قطعة DNA خطيه مع الكروموسوم الحلقي كما في حالة التحول والتوصيل والاقتران ، أذ يحصل كسر وأعادة التحام بين قطعتي DNA الخطيه من الخليه المانحه والكروموسوم الحلقي من المستلمه.



شكل 42 : عملية التأشب بين قطعة DNA خطيه مع الكروموسوم الحلقي.

ويمكن أن يحصل recombination بين جزيئتين DNA حلقية (بين بلازميد وبلازميد اخر او بين بلازميد وكروموسوم).



شكل 43 : عملية التاشب بين جزيئتين DNA حلقية.

اما التأشب المتخصص وغير المتجانس فهو لايشترط وجود مناطق واسعه من homology ولايحتاج لفعالية بروتين Rec A كمثال على ذلك التحام DNA العاثي λ مع كروموسوم الخليه البكتيريه.

الفصل الرابع

تأثير مضادات الحيوية في الخلية البكتيرية

1- تأثير مضادات الحيوية في جدار الخلية البكتيرية

1-1 تركيب جدار الخلية البكتيرية

يعد التركيب الكيميائي لجدار الخلية البكتيرية مسؤولاً عن أعطاء الجدار طبيعته الصلبة ، وهو يختلف عن جدران خلايا الفطريات بل يختلف من نوع بكتيري الى آخر ، وقد قسمت البكتريا على أساس الاختلاف في تركيب جدارها الى بكتريا سالبة لصبغة كرام (G – ve) و موجبة لصبغة كرام (G + ve).

يوفر الجدار الدعم الميكانيكي اللازم لحماية الخلية من الانفجار بسبب الضغط الانتفاخي ويعمل كحاجز في البكتريا السالبة لصبغة كرام يمنع مرور الجزيئات الكارهة للماء و الجزيئات ذات المجاميع المستقطبة وغير المستقطبة كمضادات الحيوية و المنظفات.

من الممكن تحطيم الجدار الخلوي بمعاملة الخلية مع الأنزيم الحال (Lysozyme)، وفي المحاليل عالية الملح او السكر لا تنفجر الخلية المعاملة لكنها تصبح كروية وهو الشكل الاكثر ثباتا للخلية، و تستطيع الخلية عديمة الجدار (Protoplast) انجاز العمليات الايضية.

تكون بعض البكتريا في الطبيعة فاقدة للجدار مثل *Mycoplasma* وبذلك فهي تمتلك مرونة عالية جدا في شكلها الخارجي، اما مجموعة Archae فلا تحتوي جدران خلاياها على السكريات الببتيدية (ببتيدوكلايكان Peptidoglycan) بشكلها الاعتيادي، تحوي بعض انواعها على حامض N – acetyl talosamin uronic acid بدلا عن N – acetyl glucosamine ، وصفت أشكال L–form في البداية عام 1935 من قبل معهد Lister و هي تفقد السكريات الببتيدية (Peptidoglycan) في جسم المضيف او تلقائيا خارج المضيف.

ان الجزء الاساس لجدار الخلية البكتيرية الموجبة لصبغة كرام يكون عبارة عن سكريات ببتيدية (Peptidoglycan) و التي تتكون بالأساس من سكريات امينية و احماض امينية و يكون بشكل طبقات متتالية ترتبط فيما بينهما من خلال جسور من الاحماض الامينية.

تتكـون سلسـلة السـكريات الببتيديـة مـن تعاقـب السـكريات الامينيـة و هـي N – acetyl muramic acid و N – acetyl glucose amine ،

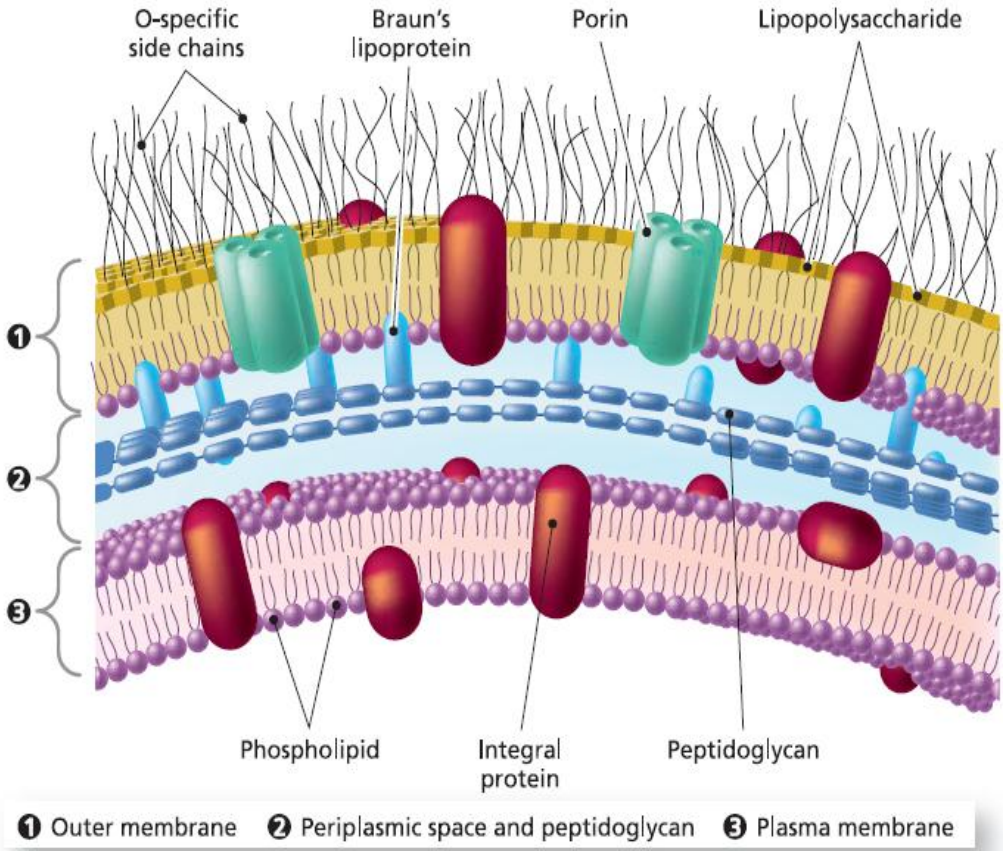
وهي مشتقة كيمياوياً من الكلوكوز. تتكرر هاتان الوحدتان لتكوين بوليمر ذا وزن جزيئي عالي و يكون موجود فقط في جدران بدائية النواة ، وله علاقة كيمياوية بالسليلوز و الكايتين. ترتبط كل سلسلة مع الاخرى بآصرة ببتيدية بين مجموعة أمينية من حامض diamino pimelic acid في واحدة من رباعية الببتيد المرتبطة بـ N–acetyl muramic acid و مجموعة الكاربوكسيل من حامض Alanine في رباعية ببتيد متصلة بحامض N–acetyl muramic acid من السلسلة المجاورة.

أضافة للببتيدوكلايكان يحتوي جدار معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام على حامض Teichoic acid [Poly (D – ribitol 5 – phosphate)] المؤلف من الكليسيرول كوحدة فرعية متكررة متآصر لـ D – alanine والفوسفات.

يستبدل في بعض البكتريا حامض Teichoic بحامض Teichuronic (Poly (N – acetyl glucosamine – phosphate)

وهو عبارة عن بولمر يحتوي Uronic acid ووحدات N – acetyl hexos amine.

الصفة الحامضية للبولمر المرتبط بالببتيدوكلايكان يعطي سطح الخلية قطبية عالية و يحمل شحنة سالبة ، ويكون لكلا الحامضين القدرة على الارتباط بأيون المغنسيوم مما يساعد في جعل الجدار أكثر قوة و متانة، كما أن لها دورا في التحكم بـ Autolysins و هي أنزيمات تعمل على تحليل الجدار أذ يسمح بتجزئة او أحداث قطع في جدار الخلية القديم مما يفسح المجال بإدخال مفردات بناء الجدار الجديد، فقد يكون التحلل الذاتي مدمراً للخلية . تتحلل بعض الخلايا عند توقف نموها بسبب تحلل جدرانها وتشكل هذه الأحماض ما يقرب من 40-50 % من كتلة الجدار، وتمثل المستضدات الأساس في سطح خلايا البكتريا الموجبة.



شكل 44 : **جدار الخلية البكتيرية الموجبة لصبغة كرام.**

يكون جدار البكتريا السالبة لصبغة كرام أكثر تعقيداً وعادة يتم دراسة جدار بكتريا *E.coli* كمثال لجدران البكتريا السالبة لصبغة كرام فهو يتألف من غشاء خارجي (Outer membrane) يحيط بطبقة رقيقة من الببتيدوكلايكان (بسمك 2 نانومتر تقريباً) وهو أرق من ببتيدوكلايكان جدار البكتريا الموجبة لصبغة كرام ويشكل نسبة 5-10 % من كتلة الجدار.

توجد الفسحة البريلازمية (Periplasmic space) بين الغشاء الخارجي والغشاء البلازمي، يتألف الغشاء الخارجي من طبقة مزدوجة من الدهون المفسفرة (phospholipid) بنسبة 20-25 % ، وتخترق البروتينات طبقة الدهون المفسفرة كلياً او جزئياً وهي تشكل نسبة 45-50 % ،أما السكريات الدهنية lipopolysaccharide (L.P.S) فتوجد بنسبة 30 % ، وبالرغم من التشابه الواضح بالتركيب بين الغشاء الخارجي والغشاء البلازمي فأن الغشاء الخارجي يختلف بشكل كبير في المكونات والوظيفة عن الغشاء البلازمي.

يتألف L.P.S من ثلاث أجزاء مرتبطة ببعضها هي متعدد السكريات المركزي (Core polysaccharide) الذي يبنى من Keto-3-deoxyoctanate (KDO) وهكسوز وأيثانول أمين وحامض الفوسفوريك وهي تعطي ثبوتية للغشاء أذ ترتبط بقوة بأيونات المغنيسيوم والكالسيوم.

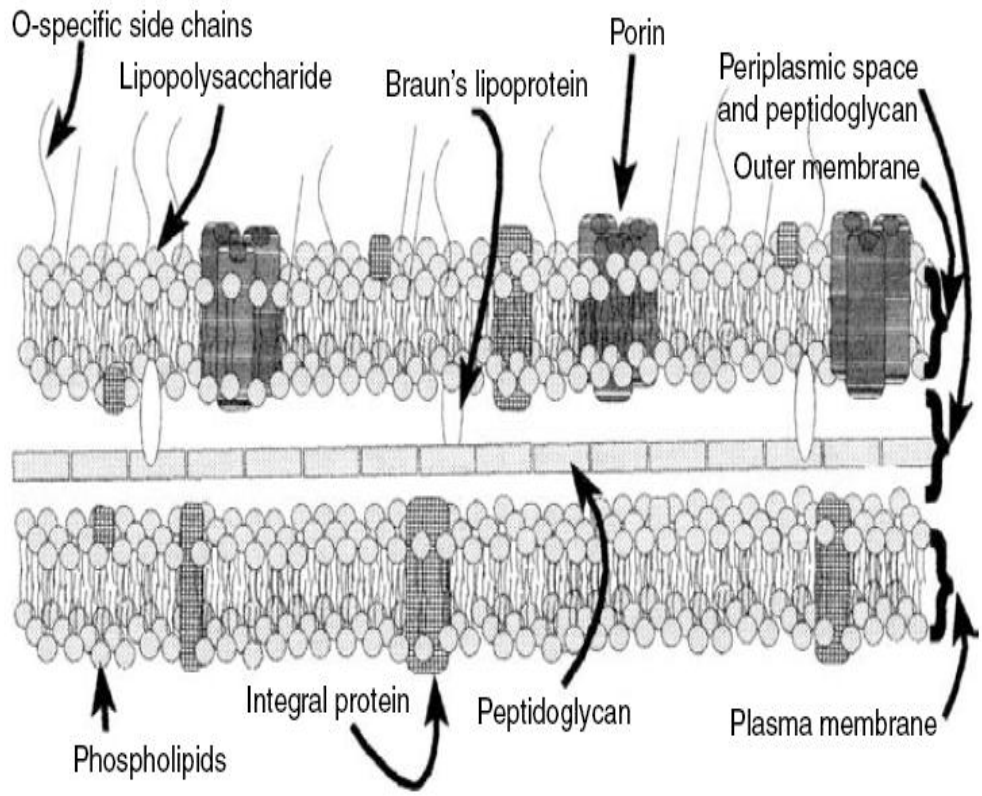
أما الجزء الثاني فهو Lipid A ويوجد للداخل من الغشاء وهو قد يتحلل الى كلوكوز أمين وحوامض دهنية طويلة السلسلة وأيثانول أمين ، وهو سام أذ يعد endotoxin وله دور مهم في عملية الإصابة بالأمراض المسببة عن أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام.

الجزء الثالث هي السلاسل الفرعية من السكريات O-specific side chain وهي تختلف من نوع الى آخر وتدعى المستضد O وهي تحفز تكوين أجسام مضادة ويكون هذا الجزء هو الأبعد عن سطح غلاف الخلية البكتيرية.

تكون معظم البروتينات في الغشاء الخارجي عبارة عن بروتينات غشائية وبروتينات دهنية موزعة خلال الغشاء الخارجي . تنتظم البروتينات القنوية (Porins) مكونة قنوات تنتقل من خلالها المواد المذابة بصورة غير نشطة وهي تسمح بمرور الجزيئات المحبة للماء (مثل السكريات الأحادية والثنائية والحوامض الأمينية والأيونات اللاعضوية وبعض مضادات الحيوية مثل البنسلين) بوزن جزيئي أقصاه 600-700 دالتون وكذلك تنتشر الجزيئات المرنة الكبيرة 800-900 دالتون خلال الثقوب لكن بصعوبة كبيرة.

تتميز البكتريا السالبة لصبغة كرام بوجود حاجزين هما الغشاء الخارجي وغشاء الخلية مما يوفر للخلية قدرة أكبر في التحكم بدخول وخروج المواد.

وتضم الفسحة البريلازمية 30-50 نوعاً من البروتينات منها أنزيمات Proteases و Nucleases وغيرها من الأنزيمات المحللة والبروتينات الرابطة لبعض المركبات مثل الكبريتات والمالتوز والكلوتامين.



شكل 45 : جدار الخلية البكتيرية السالبة لصبغة كرام.

2-1 البناء الحيوي للببتيدوكلايكان

تبدأ عملية بناء الببتيدوكلايكان ببناء أولا السكريات الامينية و هي N – acetyl muramic acid و N – acetyl glucose amine ويتم ذلك في السايتوبلازم ثم تنقل عبر غشاء الخلية بأستعمال نواقل ، بعدها يتم ربط تعاقب هذه الجزيئات بشكل سلاسل طويلة بعملية Transglycosylation . ترتبط السلاسل الطويلة ببعضها بأواصر جانبية بعملية Transpeptidation لتكوين الببتيدوكلايكان وكالأتي :

تمر عملية بناء الببتيدوكلايكان بأربع مراحل:

المرحلة الأولى : بناء مركب UDP – N – acetyl muramic acid

يبدأ البناء الحيوي في السايتوبلازم من خلال أثنين من النواتج الأيضية هي

N - acetyl glucose amine – 1 – phosphate و (UTP) Uridine triphosphate

المرحلة الثانية : بناء السلسلة الجانبية Penta peptide

يتم أضافة خمس أحماض أمينيه الى مجموعة الكاربوكسيل Muramic acid nucleotide ، كل خطوة تحتاج amino acid ligase و ATP ، اذ يضاف L-alanine بواسطة أنزيم Mur C ثم يضاف حامضين أمينيين هما D-glutamic acid بواسطة Mur D و L-Lysine او meso-diamino pimelic acid بواسطة Mur E.

تضاف في بكتريا *S.aureus* و *Streptococcus pneumoniae* مجموعة α-carboxyl لحامض glutamic acid كمرحلة أخيرة في البناء الحيوي للببتيدوكلايكان.

يتم تحويل L-alanine الى D-alanine بواسطة أنزيم racemase ثم يقوم أنزيم ligase بربط جزيئتين من D-alanine لتعطي dipeptide. بعد ذلك يتم ربط D-alanine - D-alanine الى سلسلة Tripeptide بواسطة Mur F.

المرحلة الثالثة : بلمرة الببتيدوكلايكان الخطي:

يكون البناء الحيوي للببتيدوكلايكان لحد هذه الخطوة سايتوبلازمي، بينما الخطوات التالية فهي تحدث في التراكيب الغشائية، وأن اول خطوة مرتبطة بالغشاء تتضمن تكوين Pyrophosphate من nucleotide pentapeptide و Undecaprenyl phosphate بواسطة أنزيم Mra Y وهو UDP-N-acetyl muramyl pentapeptide phospho transferase وهي مكونات الغشاء البلازمي لتكوين معقد يدعى Lipid 1 بعدها يتم أضافة hexosamine.

تضاف في بكتريا *S. aureus* وبعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام مجموعة جانبية الى مجموعة E - amino لحامض Lysine في nucleotide pentapeptide . يدخل حامض الكلايسين في العملية خلال أضافة مجموعة pentaglycine ، هذا التفاعل غير موجود في البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* .

يرتبط disaccharide decapeptide (V111) بالمستقبل ، وهنا يتكون ß-linkage من الموقع رقم 1 لحامض N-acetyl muramic acid الى مجموعة 4-hydroxyl ل N-acetyl glucosamine في سلسلة متعدد السكريات النامية ، يرتبط disaccharide decapeptide ب undecaprenyl phosphate (Lipid II) أذ يحدث هذا التفاعل بالغشاء البلازمي وتحدث أستطالة لسلسلة glycan بأضافة وحدات السكريات الثنائية بواسطة أنزيم glycosyl transferase .

المرحلة الرابعة : الجسور (السلاسل) الجانبية (cross link)

يحتوي الببتيدوكلايكان الخطي المتكون في المرحلة الثالثة على بعض المجاميع القطبية الذائبة في الماء ويكون فاقداً للقوة الميكانيكية، بعدها تتكون الجسور الجانبية بعملية Transpeptidation. تحدث هذه العملية في بكتريا *S. aureus* بين مجموعة amino الطرفية لـ pentaglycin لسلسلة ومجموعة peptide amino لحامض D-alanine الطرفي لسلسلة ببتيد أخرى وقد وجد في بكتريا *S. aureus* أن بناء الببتيدوكلايكان ينتهي بعشر سلاسل ببتيدية جانبية ترتبط ببعضها بواسطة جسور، توجد بعض التغيرات في تركيب الببتيدوكلايكان بين نوع بكتيري وآخر وحتى بين السلالات لنفس النوع لكنها تشترك في نفس سلسلة glycan.

السلاسل الجانبية للببتيد تكون دائماً أربع أحماض أمينية هي -D و -L و -D و -L ويكون الثاني دائماً D-glutamic acid يرتبط خلال مجموعة Y-carboxyl وأربع من D-alanine.

تبدل السلسلة الجانبية في الببتيدوكلايكان نوع A_1 بـmeso-2,6,diamino pimelic acid وتتكون الجسور الجانبية بين D-alanine لسلسلة جانبية ومجموعة 6-amino لـ diamino pimelic acid لسلسلة أخرى.

ويكون نوع الببتيدوكلايكان هذا موجوداً في بعض البكتريا عصوية الشكل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

تتكون الجسور الجانبية في الببتيدوكلايكان نوع B بين مجموعة α-carboxyl لحامض D-glutamic لسلسلة ببتيد جانبية و D-alanine لسلسلة أخرى.

يمتلك الببتيدوكلايكان في بكتريا *E. coli* وبقية البكتريا السالبة لصبغة كرام العصوية جسورا جانبية مفردة بين سلسلة ببتيد جانبية وأخرى وهي تملك أنزيمات transpeptidases المهمة لبناء الجسور الجانبية وأنزيمات أخرى تعرف بـ DD-carboxy peptidases التي تزيل D-alanine من السلسلة الجانبية لـ pentapeptide.

يكون أنزيم Carboxy peptidase 1 متخصص لحامض D-alanine الطرفي للسلسلة الجانبية لـ pentapeptide، بينما أنزيم Carboxy peptidase 2 على D-alanine في موقع 4 بعد إزالة D-alanine الطرفي.

يرتبط الببتيدوكلايكان في البكتريا الموجبة لصبغة كرام الكروية بحامض Teichoic وتكون نقطة الاتصال من خلال مجموعة 6-hydroxyl لحامض muramic في سلسلة glycan.

يرتبط حامض Teichoic بالببتيدوكلايكان في جدار بكتريا *S. aureus* من خلال أرتباط وحدة تتألف من ثلاث وحدات من glycerol-1-phosphate مرتبطة مع موقع 4 في N-acetyl glucose amine.

1 - 3 بروتينات **Penicillin binding proteins**

عبارة عن أنزيمات مرتبطة بالغشاء تدخل في عملية ربط السكريات الثنائية (pentapeptide) الببتيدوكلايكان الخطي . يختصر لها PBPs ، تملك موقع هدف متخصص للبنسلين ومضادات البيتالاكتام الأخرى وتكون هذه الأنزيمات متغايرة من نوع بكتيري الى آخر في العدد والحجم والألفة لمضادات البيتالاكتام، وهي توجد ضمن مجموعتين الأولى ذات وزن جزيئي عالي (أكبر من 60 كيلودالتون) والثانية ذات وزن جزيئي واطئ (أقل من 40 كيلودالتون). تتضمن المجموعة الأولى أصناف A و B و C المسؤولة عن عملية Transpeptidation وهي موقع هدف للأرتباط بالبنسلين وبقية مضادات البيتالاكتام .يساعد الصنف A أيضاً في تفاعلات transglycosylation.

يكون الصنف 1_b و 1_a في بكتريا *E. coli* ذا فاعلية في بناء الببتيدوكلايكان، الدور البنائي لـ PBP_2 يدخل أساساً في إستطالة الخلايا و PBP_3 يكوّن حاجز الخلية (Septum) أثناء انقسام الخلية.

أما بروتينات PBPs ذات الوزن الجزيئي الواطئ فتتضمن الأنواع 4 و 5 و 6 في بكتريا *E. coli* ، وتكون وظيفتها كأنزيمات Carboxy peptidases وكذلك الأنزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* و *Bacillus stearothermophilus* وهي تثبط بمضادات البيتالاكتام ، وقد وجد أن الأنزيمات في بكتريا *Streptomyces* تمتلك فعالية Transpeptidase الى جانب فعاليتها مثل أنزيم Carboxy peptidase .

أضافة الى الأصناف التي مر ذكرها من أنزيمات PBPs فهناك خمسة أخرى هي : Amp H و Amp C و Dac D و PBP 7 و PBP 1c

بينت دراسات عديدة أن أصناف PBP1b و PBP 1a و PBP 2 و PBP 3 تكون أساسية لنمو وأنقسام الخلية البكتيرية عصوية الشكل تحت الظروف المختبرية.

1-4 مضادات الحيوية المثبطة لبناء الببتيدوكلايكان

تمتلك بعض مضادات الحيوية القدرة على التداخل مع بناء الببتيدوكلايكان وقد تم أثبات ذلك من خلال عدة ملاحظات منها:

– أن الخلايا التي تفقد الجدار نتيجة الضغط الأزموزي والتي تصبح Spheroplasts تستطيع ان تنقسم وتنتج جيل جديد من الخلايا بجدران طبيعية بعد ازالة تأثير المضاد. بينما تتأثر الخلايا الطبيعية من نفس النوع بالمضاد.

– البكتريا التي لا تملك جدران أصلاً مثل المايكوبلازما وخلايا L-form (التي تملك جدار محور) لا تتأثر بالمضاد الذي يعمل على تثبيط الببتيدوكلايكان.

من أمثلة المضادات التي تعمل على جدار الخلية البكتيرية :

- **المضادات التي ترتبط مع الجزيئات الناقلة (Carrier molecules): وتشمل**

Bacitracin :

يصنف هذا المضاد ضمن مضادات متعددة الببتيد السامة والتي تستعمل ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام أذ تتداخل مع بناء جدار الخلية وهو غير فعال ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ،وقد يعود ذلك الى كبر حجم جزيئات المضاد المطلوبة لأختراق الغشاء الخارجي لكي تصل الى موقع الهدف.

يعمل هذا المضاد على تثبيط صنع الببتيدوكلايكان بارتباطه بالسلسلة الطويلة C_{55} isoprenol pyrophosphate – بوجود أيونات معدنية ثنائية التكافؤ. التداخل بين Lipid pyrophosphate والباستراسين يكوّن معقد يغلق عملية صنع الببتيدوكلايكان. أي أن المضاد يثبط عملية dephosphorylation للجزيئات الناقلة عبر الغشاء والمطلوبة لنقل مواد البناء الأساسية لدورة بناء جديدة (المواد الأولية N – acetyl muramic acid و N – acetyl glucose amine) . مضاد الباستراسين يكون معقد يتداخل مع بناء Sterol في الأنسجة الحيوانية وهذا يعد جزءا من سمية هذا المضاد للخلايا الحيوانية.

- **المضادات المثبطة لأنزيمات بناء الجدار الخلوي: وتشمل**

Fosfomycin (phosphonomycin)

يمتلك هذا المضاد تركيب بسيط جداً، وهو يعمل ضد الاصابات المتسببة عن كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، وبالرغم من سميته القليلة إلا أنه يستعمل بشكل قليل في الطب وهو يستعمل في علاج الإصابات التي يكون المسبب لها مقاوم لبقية المضادات.

يعمل هذا المضاد على تثبيط الخطوة الأولى لبناء الببتيدوكلايكان وهي تكثيف UDP-N-acetyl glucos amine مع Pyruvate بمساعدة أنزيم UDP-N-acetyl glucos amine enol pyruvat transferase (Mur A) والذي يعطي UDP-N-acetyl muramic acid. يعمل هذا المضاد على تثبيط أنزيم Mur A بأرتباط تساهمي مع Cysteine في المركز الفعال للأنزيم مكوّناً Thioester.

: Cycloserine

يكون هذا المضاد ذو تركيب بسيط وهو فعّال ضد بعض أنواع البكتريا، لكن بسبب تأثيراته على الجهاز العصبي المركزي والتي تظهر عند بعض المرضى قلل ذلك من أستعمالاته الطبية. وهو يستعمل لعلاج مرض السل عندما تكون الأصابة بسبب سلالة مقاومة للمضادات الأخرى.

يؤثر هذا المضاد على بناء الببتيدوكلايكان بتثبيط أنزيمَي alanine racemase و D-alanyl-D-alanine ligase المهمين لصنع آصرة ببتيدية لبناء السلسلة الجانبية pentapeptide. يستطيع هذا المضاد دخول الخلية البكتيرية بعملية النقل الفعّال مما يسمح له بالوصول لتركيز عال في الخلية مقارنة بالوسط.

- **المضادات التي تتداخل مع طلائع (Precursors) جدار الخلية : وتشمل**

: Glycopeptide

يعد مضاد Vancomycine أحد أفراد هذه المجموعة التي عزلت أول مرة سنة 1950 ونالت الأهمية الطبية بعد أنتشار بكتريا *Staphylococcus* المقاومة لمضاد المثيسلين (MRSA) مما زاد من أستعمالها لعلاج الإصابات المتسببة عن MRSA والبكتريا الموجبة لصبغة كرام الأخرى.

تمتلك هذه المضادات وزن جزيئي عال وبذلك فأنها تكون غير فعالة ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ، و تعتمد فعاليتها ضد البكتيرية على قابليتها على الارتباط بمجموعة D-alanyl -D-alanine الطرفية على السلسلة الجانبية للببتيد عند بناء

البيبتيدوكلايكان ، المعقد المتكوّن بين الفانكومايسين و D-alanyl-D-alanine يعمل على غلق أنزيم Transglycosylase الذي يدخل في بناء البيتيد والسكريات الثنائية داخل سلسلة البيتيدوكلايكان النامية وأنزيمي DD-Transpeptidases و DD-Carboxy peptidases (أي يثبط عملية Transglycosylation) وهنا يمنع المضاد أستغلال المادة الأساس (substrate) للأنزيم بدلاً من التداخل المباشر مع الأنزيم الهدف وهي طريقة غير اعتيادية في التثبيط.

Lipoglycopeptides :

مثل مضادات: Teicoplanin و Telavancin و Ramoplanin و Dalbavancin و Oritavancin :

يكون مضاد Telavancin قاتل للبكتريا يؤثر على نفاذية الغشاء. أما مضاد Teicoplanin فيثبط عملية Transpeptidation وبالتالي يثبط عملية بناء البيتيدوكلايكان وهو قاتل للبكتريا أيضا .

يعمل مضاد Ramoplanin على تثبيط المرحلة الأخيرة من بناء البيتيدوكلايكان والبلمرة ، أذ يثبط قابلية MurG glycosyltransferase على ربط Lipid 1 مع UDP – GicNAc لتحرير UDP وتكوين Lipid II الذي يكون أساس السكريات الثنائية في سلسلة السكريات المتعددة في البيتيدوكلايكان .

يؤثر مضاد Dalbavancin على D-alanyl -D-alanine وبالتالي يثبط عملية Transpeptidation، يكون هذا المضاد قاتل للبكتريا وهو أكثر كفاءه من الفانكومايسين و Teicoplanin ضد بكتريا *Staphylococcus* المقاومة لمضاد المثيسلين (MRSA) و بكتريا *Staphylococcus* السالبة لأنزيم Coagulase.

يعد مضاد Oritavancin قاتل للبكتريا تعتمد فعاليته على تركيزه ، فعال ضد البكتريا الموجبه لصبغة كرام الكرويه ومن ضمنها بكتريا *Enterococcus* المقاومه لمضادات الكلايكوببتيد وبكتريا *S. aureus* ، يثبط خطوة transglycosylation مما يفسر فعاليته ضد *Enterococcus* المقاومة للفانكومايسين.

- **المضادات المثبطة لأنزيمات بلمرة البيتيدوكلايكان الجديد : وتشمل**

β –Lactams:

تضم مجموعة واسعة من مضادات الحيوية تم ذكرها بالتفصيل في الفصل الأول الفقرة 1-3

تأثير مضادات البيتالاكتام في جدار الخلية:

- مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات

تتعارض هذه المضادات مع الخطوة النهائية في بلمرة الببتيدوكلايكان وتكوين الجسور الجانبية (أي عملية Transpeptidation لطرف N-terminus للحامض الأميني) . يعمل البنسلين على منافسة D-ala-D-ala للأرتباط بأنزيم Transpeptidase تعمل أنزيمات PBP_{1b} و PBP_{1a} في بكتريا *E. coli* وبعض البكتريا الأخرى كأنزيمات مفتاح تدخل في بناء الببتيدوكلايكان ، أما أنزيمات PBP_3 و PBP_2 فهي أنزيمات إعادة ترتيب نموذج الببتيدوكلايكان خلال انقسام الخلية. أن جميع أنزيمات PBPs هي هدف لمضادات البيتالاكتام إذ تظهر معظمها ألفة مختلفة تجاه هذه المضادات.

تسبب المضادات التي ترتبط بقوة لأنزيمات PBP_{1a} و PBP_{1b} تحلل الخلية بتراكيز ضد بكتيرية قليلة . ترتبط مضادات السيفالوسبورين بقوة الى أنزيم PBP_3 فتثبط septation وتقوم بتكوين الخيوط (Filaments) التي تطيل الخلايا.

يرتبط مضاد Mecillinam بأنزيم PBP_2 مسبباً تغير شكل الخلايا الى شكل بيضوي غير طبيعي، وتكون الخلايا المنتجة لأنزيم PBP_2 بمستوى عال حساسة جداً لمضاد Mecillinam.

- مضادات Carbapenems :

تشمل مضادات Imipenem و Meropenem و Ertapenem و Faropenem والتي تنتشر بسرعة خلال الغشاء الخارجي لمعظم البكتريا السالبة لصبغة كرام :

بالنسبة لمضاد **Imipenem** : يثبط فعالية transpeptidase لأنزيمات PBP_{1b} و PBP_{1a} و PBP 2 ، وفعالية D-alanine carboxypeptidase لأنزيمات PBP_4 و PBP_5 ، وفعالية Transglycosylase لأنزيمات PBP_{1A} ، وهو مثبط ضعيف لفعالية transpeptidase لأنزيم PBP 3 . على عكس مضادات البيتالاكتام الأخرى فهو يرتبط بشكل أفضل لأنزيمات PBP_1 و PBP_3 . يحفز مضاد الأمبنيم تمزيق الخلية ، ولا يثبط تكوين الحاجز (septum) من قبل الخلية . عند أستعمال الأمبنيم من قبل الأنسان يجب ان يعطى خلطا مع Cilastatin (مثبط انزيم Dehydropeptidase 1(DHP 1) الذي ينتج من الخلايا الطلائية الكلوية المحللة للأمبنيم) . اما مضاد Meropenem فيكون غير حساس لأنزيم DHP1.

بالنسبة لمضاد **Ertapenem** : يرتبط بقوة لأنزيم PBP2 في بكتريا *E.coli* وبأنزيم PBP 3 ، له ألفة أرتباط جيدة بأنزيم PBP-1a و PBP-1b .

بالنسبة لمضاد **Faropenem** : مضاد قليل الحساسية لأنزيم DHP1 الكلوي مقارنة بالأمبنيم ، له ألفة تفضيلية لأنزيمات PBP_2 و PBP -1a و PBP-1b و PBP3 ، تراكيز المضاد تحت التركيز المثبط الأدنى (MIC) تؤثر على تكوين الحاجز (septum) في بكتريا *S.aureus* مع تقليل عدد الخلايا الحية بزيادة تراكيز المضاد . التأثيرات نفسها تلاحظ مع بكتريا *E.coli* مع تغييرات في شكل الخلية عند التراكيز تحت MIC ، ويحصل تحلل الخلايا عند التركيز المساو أو أعلى من MIC .

- مضادات Monobactams :

مثالها مضاد Aztreoname الذي يرتبط مع PBP 3 الموجودة في البكتريا السالبة لصبغة كرام الهوائية لأنه لا يرتبط مع أنزيمات PBPs في البكتريا الموجبة لصبغة كرام الهوائية او اللاهوائية .

5-1 جدار بكتريا السل

يكون جدار بكتريا السل معقد ذو نفاذية قليلة جداً يتميز عن جدران بقية البكتريا بوجود arabinogalactan-peptidoglycan Mycolyl ويرتبط الـ Arabinogalactan

بالببتيدوكلايكان من خلال آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر وترتبط السكريات الثنائية بـ galactan.

يكون Arabinogalactan عبارة عن سكر متعدد يتألف من سلسلة كالكتان مستقيمة تتألف من وحدات 5,6-β-D-galactofuranose ترتبط مع C-5 لوحدات 6-linked galactofuranose.

الجدير بالذكر أن النمو البطيء لبكتريا السل يجعلها مقاومة للمضادات مما يجعل العلاج يستمر لعدة أشهر.

هناك مضادات تثبط الجدار بطريقة مختلفة عمّا ذكر أعلاه، ففي حالة Isoniazid الذي يستعمل بصورة تآزرية مع الريفامبسين و pyrazinamide و ethambutol لوحظ أنه يؤثر على أنزيم يختصر له Inh A الذي يشفر له بجين *inh* A .

عمل الأنزيم يدخل في استطالة الأحماض الدهنية في بناء mycolic acid وبالتالي فأن تثبيط بناء حامض mycolic يؤثر على المعقد Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan مما يسبب فقدان حيوية الخلية. أما الطفرات في جين *Inh* A فتكون مقاومة لـ isoniazid.

أشارت الدراسات الحديثة الى أهمية ناتج الجين *Kat* G المشفر لـ catalase-peroxidase وناتج الجين *Kas* A كموقع بديل لفعل Isoniazid وهو يشفر لأنزيم (Kas A) β-Keto acyl synthase الذي يدخل في بناء الأحماض الدهنية المهمة لبناء حامض mycolic.

أما مضاد Ethambutol فقد أستعمل ضد بكتريا السل منذ سنة 1961 وله طيف واسع يشمل اضافة لبكتريا السل بكتريا *M. avium* وهو يعمل على غلق بناء Polysaccharid arabinan لكن بميكانيكية غير معروفة.

الهدف الجزيئي لهذا المضاد هو أنزيم arabinosyl transferase الذي يشفر بثلاث جينات تركيبية هي *emb* C و *emb* B و *emb* A والذي يعمل على بلمرة الارابينوز في arabinan.

أما مضاد Pyrazinamide فهو يؤثر في أنزيم amidase الذي يشار له كأنزيم Pyrazinamidase ، فقد وجد أن سلالات بكتريا السل المقاومة لـ Pyrazinamide تكون فاقدة لفعالية Pyrazinamidase ويعمل هذا المضاد على غلق طلائع (precursors) الحامض الدهني لبناء الحامض الدهني FAS II الذي يلعب دوراً أساسياً في استطالة أحماض mycolic.

الجـدير بالـذكر أن جـدران الفطريـات لا تحـوي ببتيـدوكلايكان لـذلك فـأن مضـادات البيتالاكتام و الكلايكوببتيد لاتؤثر فيها، اذ يكون جدار الخلية الفطرية متعدد الطبقات يتكون من جزيئات كبيرة تتضمن الكايتين و glucan و mannoproteins، والمعروف أن الكايتين والكلوكان تكون غير موجودة في جدران الخلية البكتيرية واللبائن وبالتالي تكون مهمة كهدف انتقائي لعمل مضادات ضد الفطريات.

من جانب آخر هناك مضادات تثبط glucan مثل مضادات Echinocandin منها Caspofungin الـذي يسـتعمل لعـلاج اصـابات فطـر *Aspergillus* و مضـاد Micafungin الذي أستعمل حديثاً لعلاج الإصابات الفطرية.

2- تأثير المضادات في غشاء الخلية البكتيرية

2-1 تركيب غشاء الخلية البكتيرية:

يتكون الغشاء الخلوي (Cell membrane) من الدهون الفوسفاتيه (Phospholipids) والبروتينات ، أذ يتكون من طبقتين من الدهون الفوسفاتيه وتكون الأجزاء المحبه للماء الى الخارج والطبقة الوسطى تكون كارهة للماء وهي الأساس في نضوحية الأغشية ، هناك أنبعاجات من

الأغشية الخلوية مكونة أجسام وسطية تشارك في عمليات تكوين الجدران العرضية عند الأنقسام ويعتقد أنها تزود تلك المناطق بالطاقة لأحتوائها على السلاسل التنفسية .

يكون الغشاء الخلوي في البكتريا فاقدا للستيرولات (Sterols) ما عدا في بكتريا *Mycoplasma* يندمج الكولستيرول في أغشيتها عند نموها في وسط يحوي على ستيرولات .

للغشاء الخلوي وظائف عديدة منها : تنتقل من خلاله المواد الذائبة في الدهون كونه شبه ناضح ، تستطيع المواد واطئة الوزن الجزيئي النفوذ عبر الغشاء الى الجزء الداخلي للخلية ويجب ان تكون الجزيئات الداخلة للخلية البكتيرية قطبية قابلة للذوبان في الماء. كذلك يحتوي الغشاء الخلوي على مكونات السلاسل التنفسية ونظام نقل الألكترونات وتوليد الطاقة في البكتريا الهوائية ، وتنتقل من خلاله معظم أنزيمات التحلل المائي (الأنزيمات الخارجية) . وتوجد الجزيئات والأنزيمات التي تشترك في صنع العديد من مكونات الخلية مثل الجدران الخلوية والدهون الفوسفاتيه الغشائيه و DNA ، أضافة الى ذلك فأن الغشاء الخلوي يحمل البروتينات والمستلمات الخاصة بظاهرة الأنجذاب (Taxis).

تدخل المركبات الى سايتوبلازم الخلية البكتيرية من خلال أحدى عمليتين هما : الأنتشار المنفعل (Passive diffusion) والنقل الفعال (Active transport)، في حالة الأنتشار المنفعل تتدفق الجزيئات بصورة حرة داخل وخارج الخلية دون صرف طاقة من قبل الخلية ، ويحدث الأنتشار الى ان يصبح تركيز الجزيئة هو نفسه داخل وخارج الخلية ، أما في حالة النقل الفعال فأن الخلية تستهلك طاقة لنقل الجزيئات داخل وخارج الخلية ، وعادة تنقل الخلية الى داخلها أكثر مما تنقل الى خارجها وبالتالي تتراكم الجزيئات داخل الخلية ، ونظرا لأن البكتريا تعيش في بيئات تحتوي على العديد من المواد المغذية بتراكيز واطئة جدا فيكون الأنتشار الحر غير كافي ليجهز التراكيز المطلوبة من المواد المغذية لذا يكون النقل الفعال مهما في هذه الحالة.

2-2 المضادات المؤثرة في غشاء الخلية:

***مضادات الببتيد (Cationic peptide) :** تضم هذه المجموعة مضادات Tyrocidins و Tyrocidins S و Gramicidins و Polymyxins وهي تحوي مجموعة أمينية حرة واحدة أو مجموعتين وتكون ذات فعالية جيدة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

يمتلك مضاد Polymyxin حلقة متعددة الببتيد صغيرة ترتبط بسلسلة أخرى من متعدد الببتيد تنتهي بأحماض دهنية. أن جميع مضادات الببتيد الحلقية تمتلك شحنة موجبة. وتكون فعاليتها ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام عالية ويمكن عمل تحوير كيمياوئي لمضاد بولمكسين ليكون ذو فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام.

إضافة للببتيدات الحلقية هناك مئات الببتيدات الخطية تكون ذات فعالية ضد مايكروبية تعزل من بعض الأنواع من بدائية وحقيقية النواة مثالها Maganin II ويكون ذا طول 12–50 حامض أميني وهي تحمل أيضاً شحنة موجبة لوجود اللايسين والارجنين بنسبة أعلى من الأحماض الأمينية الحامضية.

تكون مضادات الببتيد ذات أستخدام ضيق في المجال الطبي لأنها تحطم غشاء خلايا اللبائن.

يعد مضاد بوليمكسين قاتل للبكتريا بتراكيز قليلة وهو يرتبط بـ Outer membrane في البداية ويؤثر أساساً على L.P.S ويؤدي الى حدوث ثقوب بايولوجية وتكون الأيونات ثنائية التكافؤ مثل Ca^{+2} و mg^{+2} مهمة لفعاليته.

يكون مضاد Tyrocidins قاتل للخلايا البكتيرية يعمل على غشاء الخلية وهو فعّال ليس فقط ضد البكتريا انما له فعالية كذلك ضد فطر *Neurospora crassa*.

من جانب اخر نالت مضادات Magainins (تعزل اساساً من جلد الضفدع) اهتماماً واسعاً من الناحية الطبية .

مضاد Gramicidin A : يكون هذا المضاد قنوات متخصصة لأيونات أحادية التكافؤ، يشبه في خواصه الكيميائية الحيوية مضاد Valinomycin ، له خصوصية لايونات البوتاسيوم ومن خلال ذلك يعبر اغشية الدهون يعمل على تكوين ثقوب تسمح لمرور الايونات خلال الغشاء وهو مضاد متعدد الببتيد خطي يسبب تحلل كريات الدم الحمراء لتداخله مع طبقة الدهون الثنائية للكريات الحمراء .

وهناك **مضاد Gramicidin D**: تكون له فعالية ضد طفيلي الملاريا *Plasmodium falciparm* .

مضادات Ionophoric:

تمتلك هذه المضادات فعالية ضد بكتيريه الا انها لاتستعمل في علاج الاصابات البكتيرية في الانسان لانها فاقدة الخصوصية أذ تعمل بشكل كفوء على اغشية الخلايا الحيوانية وتكون سامة وهي تمتلك بعض التطبيقات في الطب البيطري كذلك تستعمل في التجارب الكيميائية الحياتية.

تمتلك هذه المضادات فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما تكون فعاليتها اقل ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام لان غشائها الخارجي يكون غير نفاذ للمركبات الكارهة للماء ، تمتلك

مركبات Monensin و Lasalocid فعالية ضد طفيلي *Eimeria tenella* المسبب لأصابة Coccidiosis في الدواجن وضد بكتريا *Clostridium perfringenes* .

مضاد Valinomycin :

مضاد حلقي مرتبط مع ايونات البوتاسيوم وهذا الارتباط يسمح له بالانتشار خلال المناطق الكارهة للماء في الغشاء فتتحرك الجزيئة خلال دهون الغشاء ، ويكون هذا المضاد متخصص بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام وهو يؤثر في نمو البكتريا الهوائية أذ يؤثر على الفسفرة التاكسدية كذلك فهو يعطل الفسفرة التاكسدية في مايتوكوندريا خلايا حقيقية النواة.

مضاد Nonactin:

يعرف كذلك بمضاد Macrotetrolides وهو ذو تركيب حلقي يشبه بفعاليته مضاد Valinomycin.

مضاد Monensin :

تكون الجزيئات في هذه المركبات غير حلقية لكن المعقد المتكون يكون فيه الايون محاط بذرة اوكسجين ، يستعمل هذا المركب في علاج مرض Coccidiosis في الدجاج ويمكن أعطاءه فموياً.

مضادات Lipopeptides

مثالها مضاد Daptomycin الفعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام المقاومة ويكون قاتل للبكتريا ، له فعل قاتل سريع للخلية ناتج عن أرتباطه بغشاء الخلية ، تتداخل سلسلة acyl للمضاد مع غشاء الخلية بوجود ايونات الكالسيوم.

هناك مجموعة من المضادات تؤثر في غشاء خلايا الفطريات مثالها مجموعة polyne التي تنتج من قبل *Streptomyces spp* تكون أغلبها سامة للانسان ، أستخدم منها Amphotericin B في علاج أصابات الفطريات عند الانسان وهو فعال ضد الاعفان والخمائر وغير فعال ضد البكتريا .

مضاد Nystatin: فعال لمعالجة الاصابات الموضعية لخميرة *Candida* .

مضاد Pimarcin : يكون قليل السمية يستعمل لحفظ الاغذية ضد التلوث بالفطريات. موقع عمل هذه المضادات هو sterol و ergosterol وهذا يفسرعدم تاثر الخلايا البكتيرية بمضادات polyenes لأن غشائها لا يحوي sterols.

من المضادات التي تؤثر في وظيفة غشاء خلية الفطريات بتداخلها مع ergosterol :

A) Azoles وتضم Imidazoles و Triazoles ومثالها Miconazole و Ketoconazole

b) Allylamines مثل Naftifine و tolnaftate

c) Morpholines تستخدم في الزراعة كمضادات للفطريات كونها سامة.

3. مثبطات بناء الأحماض النووية:

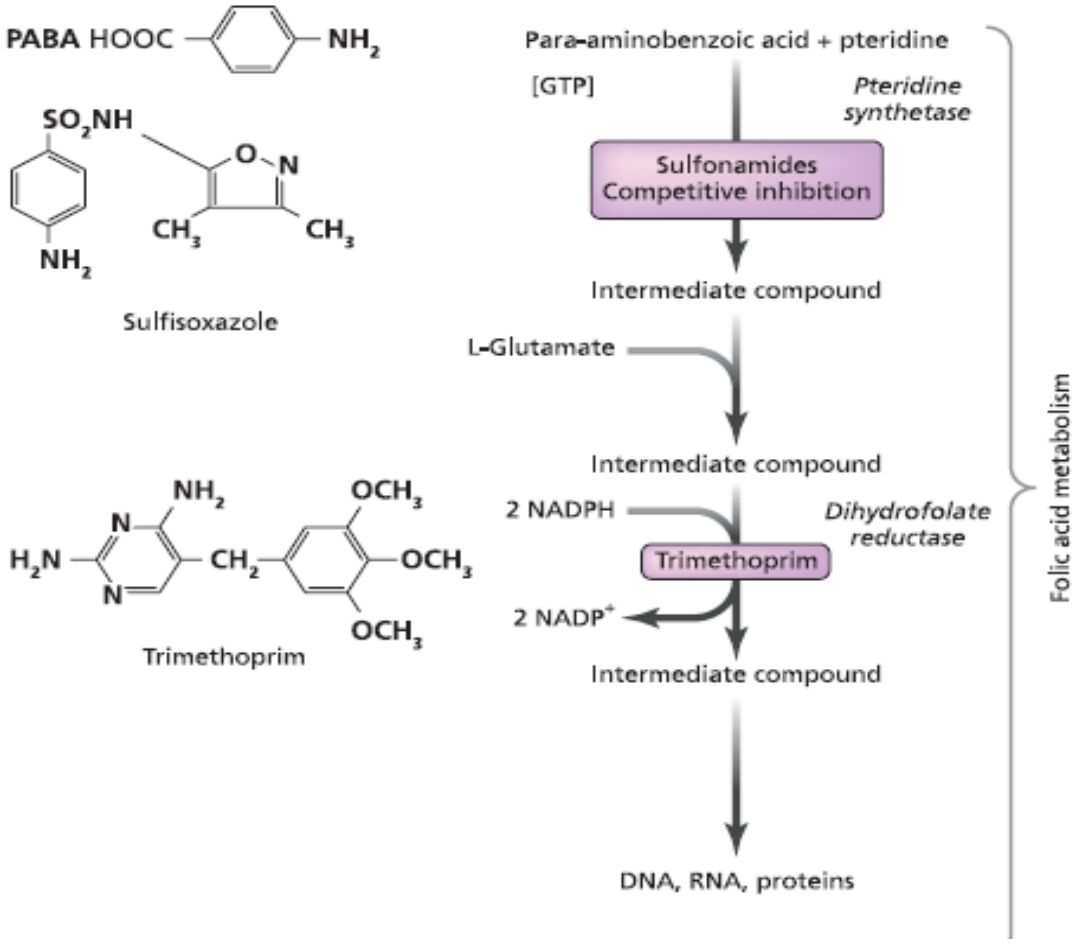
أن بناء جزيئات DNA وRNA يعد أساسيا لوظيفة الخلايا، وان تثبيط بناء هذه الجزيئات سيسبب تثبيط انقسام الخلية وبناء البروتين .هناك عدة مجاميع من المضادات تتداخل مع بناء الحامض النووي ، فقد تتداخل مع بناء البيورينات والبرميدينات او تعمل على تثبيط أنزيم DNA Polymerase او بلمرة الحامض النووي وعملية التضاعف والاستنساخ ويمكن أيجاز ذلك بما يأتي :

3-1 : المركبات المؤثرة في بناء وتمثيل طلائع النيوكليوتيدات وتتضمن هذه المركبات :

1- مضادات السلفونومايد Sulfonamide:

تعمل ضد مدى واسع من البكتريا وقد تم التطرق لها في الفصل الأول(الفقرة 3 -9 -1) . يدخل مركب Para-aminobenzoic acid (PABA) في المسار الأيضي لصنع حامض الفوليك (Folic acid) والذي يتفاعل مع مركب Hydroxymethyl dihydropteridine بوجود أنزيم Dihydropteroic Synthetase (DHPS) ليعطي مركب Folic acid وهذا بدوره يتحول الى Tetrahydrofolic acid بوجود أنزيم Dihydrofolate Reductase (DHFR) من ثم يتحول الى Pyrimidines و purines التي تدخل في صنع DNA .

يعمل مضاد Sulphonamide على تثبيط عمل أنزيم DHPS في حين يثبط مضاد Trimethoprime أنزيم DHFR.



شكل 46 : تثبيط صنع حامض الفوليك بتأثير مضادات Sulphonamide و Trimethoprim .

2- **Nucleoside analogues** وتشمل :

A) **مركب 5-Fluorocytosine (5-Fc)** :

تم تحضير pyrimidine في الاصل كمضاد للسرطان ، الا انه يستعمل الان لعلاج أصابات الخمائرالمرضية مثل *Cryptococcus* و *Candida* ويعطى خلطا مع مضاد Amphotericin-B وهو لايمتلك الفعالية بنفسه لذا يجب ان يتحول الى مركبات مثبطة

فعّالة ، عند دخول مركب 5-fc لداخل الخلية الفطرية فانه يتحول الى 5-fluoro uracil (ذو سمية عالية لجميع خلايا اللبائن) بفعل أنزيم Cytosine deaminase وهذا الانزيم يكون غير موجود في خلايا الانسان .

يؤثر مركب Flurouracil -5 في أيض النيوكليوتيدت خلال سلسلة تفاعلات معقدة ويكون الناتج النهائي هو 5-fluorodeoxy-5-monophosphate الذي يثبط انزيم Thymidylate synthase وكذلك بناء DNA ، من جانب أخر فهو يؤثر كذلك في بناء RNA .

الجدير بالذكر ان الفطريات الخيطية تكون فاقدة للانزيم المسؤول عن أيض مركب 5-FC وبالتالي فهي لاتتاثر بهذا المضاد.

B) Anti-viral nucleoside analogous

تعد بعض هذه المركبات مضادة للفايروسات مثل Ribavirin : وهو مضاد فعال ضد فايروسات DNA و RNA ، يستعمل لعلاج اصابات الرئة في الاطفال المتسبب عن الفايروسات التي تصيب الجهاز التنفسي ويمكن ان يخلط مع انترفيرون α لعلاج التهاب الكبد الفايروسي نوع C .

: Acyclovir& ganciclovir

يستعمل مركب Acyclovir لعلاج أصابات herpes simplex وأصابات varicella –zoster . بينما يكون ganciclovir فعال ضد فايروسات herpes وبشكل محدود ضد Cytomegalo virus(CMV) .

يكون مركب Vidarabine فعال ضد Herpes و CMV وهو يثبط أنزيم DNA polymerase للفايرس و ribonucleotide reductase.

يستعمل مركب 5-Iododeoxy uridine في علاج أصابات herpes خاصة في قرنية العين وهو يؤثر في تضاعف DNA الفايروس وعملية الاستنساخ ويؤثر في DNA المضيف .

2-3 : مثبطات أنزيم reverse transcriptase:

يوجد عشر مركبات تثبط أنزيم reverse transcriptase لفايرس HIV والذي يعمل على أستنساخ DNA من RNA.

3-3 : مثبطات ألأنزيمات المهمة في تضاعف DNA :

تتضمن عملية تضاعف DNA في بدائية وحقيقة النواة مجموعة من الانزيمات تشمل أنزيمات Topoisomerases التي يمكن ان تكون هدفا لمضادات الحيوية . تترتب جزيئة DNA داخل الخلية البكتيرية بدرجة عالية من التركيب المنتظم بعملية ve supercoilling– (لف لليسار) بوساطة أنزيمات متخصصة تغير الشكل ثلاثي الابعاد لجزيئة DNA وتحافظ بنفس الوقت على التركيب الاولي والمعلومات الوراثية فيه ، فتعد هذه الانزيمات ضرورية لعملية التضاعف والاستنساخ اذ لا تبدء عملية تضاعف DNA الا بتحويل الشكل ve supercoiling– الى DNA مسترخي بوجود أنزيمات Topoisomerases والتي توجد بأربع أنواع في البكتريا : يدعى النوع Topoisomerase 2 بأنزيم DNA gyrase ويعمل على أعادة شريطي DNA للالتفاف مرة ثانية بعد التضاعف وهو يعد هدفا لعدة أصناف من مضادات البكتريا بينما لايكون هذا الأنزيم في خلايا اللبائن هدفا لتلك المضادات .

من المضادات المؤثرة في أنزيمات Topoisomerases :

مضادات Quinolones :

تضم هذه المجموعة عددا من المركبات المهمة المستعملة في الطب كمضادات بكتيرية مهمة فهناك مضادات Nalidixic acid و Oxolinic acid التي تدعى كوينولونات الجيل الاول وتمتلك طيفاً واسعاً بالتأثير ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام. ومضاد Ciprofloxacin من الجيل الثاني الذي يكون اكثر كفاءة وأوسع طيفا ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، ومضاد Gemifloxacin ذو الكفاءة العالية ضد بكتريا *Streptococcus* و *Staphylococcus*.

تبدأ الفعالية ضد البكتيرية للكوينولونات بتثبيط أنزيم DNA gyrase فيحصل تراكم قطع الاشرطة المزدوجة المقطوعة في جينوم الخلية البكتيرية مما يسبب أعاقة للحركات الاساسية لجزيئة DNA وأنزيم RNA Polymerase على طول قالب DNA مما يفسر الفعل القاتل للكوينولونات.

يكون أنزيم DNA gyrase أنزيم رباعي يعمل قبل شوكة التضاعف له وحدتين فرعية هما Gyr A و Gyr B تشفر بجينات *gyr A* و *gyr B* .

يبدأ فعل الكوينولونات على الوحدة الفرعية Gyr A اذ وجد ان أغلب الطفرات في منطقة Gyr A تكون مقاومة لهذه المضادات .

بالرغم من ان أنزيم Topoisomerase 2 (DNA gyrase) يعد هو الهدف الرئيسي لفعل الكوينولونات الأ ان النوع Topoisomerase 4 (Topoisomerase IV) يثبط كذلك بفعل بعض الكوينولونات ، فقد وجد ان في بكتريا *S. aureus* يكون الأنزيم الهدف الرئيسي للكوينولونات ، وفي بكتريا *Streptococcus pneumoniae* فأن تثبيط كلا من أنزيمي DNA gyrase و Topoisomerase 4 يكون بفعل الكوينولونات.
الجدير بالذكر ان أنزيم Topoisomerase 4 لايحفز ve supercoiling– لجزيئة DNA لكنه يلعب دور مهم في أنعزال (partitioning) جزيئة DNA خلال أنقسام الخلية ، وهو يعمل خلف شوكة التضاعف .
يتكون أنزيم Topoisomerase 4 من وحدتين فرعية Par C و Par E (تشفر بجينات *par C* و *par E*) في بكتريا *E. coli* ، أما في بكتريا *S. aureus* فتدعى الوحدتين ب GrIA و GrIB (تشفر بجينات *grI A* و *grI B*).
لا توجد تفاصيل لكيفية تاثير الكوينولونات في أنزيم Topoisomerase 4 لكن وجد ان هناك تشابه في الوحدتين الفرعية Par C و Par E التي يتكون منها الانزيم أعلاه مع الوحدتين الفرعيه Gyr A و Gyr B التي يتكون منها الانزيم DNA gyrase لذلك فان المضاد يرتبط بكلا الأنزيمين بشكل متشابه.
يكون موقع عمل مضاد Lavofloxacin هو أنزيم Topoisomerase 4 أما موقع عمل مضادات Moxifloxacin و Gatifloxacin فهو DNA gyrase.
يرتبط أنزيم DNA gyrase بسهولة بمضادات الكوينولون في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، أما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام فيكون أنزيم Topoisomerase 4 مفضل لمضادات الكوينولون.

Cyclothialidine& Coumarins

تعد مركبات Coumarins و Novobiocin و Cyclothialidine من المضادات المثبطة لعملية ve supercoiling– لجزيئة DNA ويكون الموقع الهدف هو الوحدة Gyr B لأنزيم DNA gyrase .
تكون هذه المضادات ضعيفة الامتصاص في القناة الهضمية وتكون فعاليتها اساساً ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام اذ ان اختراقها يكون محدودا لخلايا البكتريا السالبة لصبغة كرام.
يكون مضاد Cyclothialidine أضعف هذه المضادات في أختراق غشاء الخلية فيكون

مضاد بكتيري ضعيف . بدءت في السنوات الاخيرة أبحاث تهدف لأجراء تحويرات كيميائية لهذا المضاد لانتاج مركبات عدة اكثر اهمية وفعالية ضد بكتيرية.

4-3 مثبطات أنزيم RNA polymerase

تعتمد عملية أستنساخ RNA على الشريط المشفر (Coding strand) لجزيئة DNA على أنزيمات RNA polymerases في بدائية وحقيقية النواة ، وهناك مجموعة من المضادات تؤثر في أنزيمات الاستنساخ منها مجموعة ريفامايسين(Rifamycins) التي تنتج من بكتريا *Streptomyces* وتضم Rifampicin (Rifampin) و Rifaximin . يعد مضاد Rifampicin كفوء وقد أستعمل لعلاج مرض السل عند خلطه مع مضادات أخرى وهو فعال ضد بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام لكنه يكون اقل فعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام . من الناحية الكيميائية فهو قريب من مضادات Strptovaricins ، تمتلك كلا المجموعتين من المضادات طريقة تاثير متشابهة فهي مثبطات قوية لبناء RNA في البكتريا الحساسة.

يكون موقع الهدف لهذه المضادات هو الوحدة β (من مكونات أنزيم RNA Polymerase) ، وقد أوضحت الدراسات على بكتريا *E.coli* ان هناك موقعين منفصلين على الوحدة β الموقع الاول i (initiation site) والثاني يدعى الموقع i + 1 . لا تتأثر خلايا اللبائن بهذا المضاد لأن الأنزيم فيها يكون غير حساس للمضاد.

يكون مضاد Rifaximin مشتق نصف مصنع يستعمل لعلاج الأصابات المعوية ، ولا يمتص بالأمعاء ، يرتبط بوحدة β للأنزيم ويثبط مرحلة بدء استنساخ RNA .

يعمل مضاد Strptolydigin على تثبيط أنزيم الاستنساخ في البكتريا اذ يثبط أستطالة السلسلة النامية لجزيئة RNA أضافة لعملية بدء ألأستنساخ وموقع الهدف هي الوحدة β لأنزيم الاستنساخ (بشكل Core enzyme) فيمكن ان يرتبط المضاد بالمعقد المتكون من أنزيم الاستنساخ وقالب DNA مما يؤخر هجرة الانزيم على طول قالب DNA بدون تأثر عملية الاستنساخ ، وقد كشفت دراسات على بكتريا *E.coli* ان المضاد يسرع أنهاء الاستنساخ وأنفصال سلسلة RNA النامية .

5-3 التداخل مع بناء الاحماض النووية

يمكن ان تتوقف عملية بناء الاحماض النووية بمنع تجهيز النيوكليوتيدات الاساسية او انهاء نمو سلسلة الحامض النووي او بالتثبيط المباشر لأنزيمات Polymerases أو

بتكوين معقد مع الحامض النووي .وهناك بعض المركبات تمتلك فعالية ضد السرطان مثل Actinomycin-D و Bleomycin و Mitomycin-C لكنها تمتلك سمية ضد خلايا اللبائن وبذلك فليس لها تطبيقات في العلاج ضد المايكروبات.

Nitroimidazole : تكون سامة للخلايا اللاهوائية ، أذ تنتشر عبر الغشاء الخلوي وتسبب كسر في شريط DNA وتعمل على تثبيط عملية الأصلاح كذلك تؤثر على عملية الأستنساخ وبالتالي تكون قاتلة للخلية.

4- مثبطات بناء البروتين

هناك ثلاث أصناف رئيسية للرايبوسوم هي 80S في خلايا حقيقية النواة و 70S في خلايا بدائية النواة و 50 S - 55 S في مايتوكوندريا اللبائن ، وهناك رايبوسوم صغيرة في البلاستيدة الخضراء في النباتات . يوجد من ضمن مكونات الرايبوسوم الحامض النووي الرايبوسومي rRNA الذي يوجد بثلاث انواع هي :

19S و 18S و 5S في رايبوسوم 80S في الخلايا الحيوانية.
25S و S 18 و 5S في رايبوسوم 80S في الخلايا النباتية.
S 23 و 16S و S 5 في رايبوسوم 70S في خلايا بدائية النواة.

أما رايبوسوم S 55 فهي تحوي نوعين من RNA هي 16S و S 12.
تتالف الرايبوسوم كذلك من البروتين ، تحوي الوحدة الصغيرة 30S في بكتريا *E.coli* على 21 بروتين و الوحدة 50S على 34 بروتين ، وتكون تتابعات الاحماض الامينية في هذه البروتينات معروفة .
تتضمن عملية بناء البروتين ثلاث مراحل هي مرحلة البدء ومرحلة الاستطالة ومرحلة الانهاء وقد مر تفصيلها في الفصل الثاني (الفقرة 2-2) من هذا الكتاب .
هناك مجموعة من مضادات الحيوية تعمل على تثبيط عملية صنع البروتين يمكن وضعها في مجاميع حسب طبيعة عملها منها :

1-4 مثبطات تكوين aminoacyl- tRNA

تعمل بعض المركبات مثل ethionine و norleucine و N-ethylglycin و 3,4-dehydroproline على تثبيط تكوين معقد aminoacyl-tRNA . بعض

المركبات مثل Borrelidin و Furanomycin و Indolmycin تنافس بعض الاحماض الامينية مثل Threonine و isoleucin و Tryptophan بالترتيب . لكن أغلب هذه المثبطات ليس لها تطبيقات طبيه.

يعد مركب Mupirocin (Pseudomonic acid A) من أهم مثبطات aminoacyl- tRNA synthesis الذي ينتج بواسطة بكتريا *Pseudomonas flourescens* وتكون له فعالية ضد بعض انواع بكتريا *Staphylococcus* خاصة *S. aureus* المقاومة للمثيسلين ، يكون هذا المضاد محدود الفعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Haemophilus influenza* و *Neisseria gonorrhoae* و *N.meningitidis* .

بالرغم من ان مركب Mupirocin يمتص جيدا بعد الجرعة الفموية وهو فعال في علاج أصابات الجلد impetigo المتسببه عن بكتريا *Sreptococcus pyogenes* و *S. aureus* ، تعتمد الفعالية ضد البكتيرية لمركب Mupirocin على تثبيط متخصص لأنزيم isoleucyl tRNA Synthetase .

4-2 : مثبطات مرحلة البدء (بدء الترجمة)

Streptomycin :

من مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدات ، ذو تركيب كيمياوي معقد ، أكتشف في سنة 1940م . يعد أول مضاد فعال ضد مرض السل ، ألا انه اصبح اقل شيوعا في استعمالاته كعلاج لهذا المرض في الوقت الحاضر . وهو مضاد واسع الطيف فعال ضد مدى واسع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .هناك عدة اسباب تقلل من أستعمالاته منها :

* يكون ضعيف الامتصاص في القناة المعوية لذا يعطى عن طريق الحقن .
* يوثر على العصب الثامن كبقية مضادات الامينوكلايكوسيدات .
* يسبب ضرر للكلية .
*ظهور مقاومه بكتيرية له بسرعة .

يكون مضاد الستربتومايسين قاتل للبكتريا (bacteriocidal) ، ويؤثر على بدء عملية الترجمة والاستطالة فهو يثبط بدء تكون سلسلة الببتيد كذلك يبطء أستطالة السلسة الكاملة جزئياً الا أن استطالة السلسلة لا تثبط بالكامل حتى بالتراكيز العالية من المضاد ، كذلك فأن فعالية أنزيم Peptidyl transferase لا تتأثر بمضاد الستربتومايسين.

يرتبط الستربتومايسين بقوة بشكل غير عكسي بالرايبوسوم 70S وتكون الوحدة الصغيرة 30S موقع هدف لمضاد الستربتومايسين وهو لا يرتبط بالوحدة 30S في الخلايا المقاومة للمضاد ولا يسبب القراءة الخاطئة لشريط mRNA .

ان هذه التاثيرات غير الطبيعية في الخلية مثل خلل الوظائف الطبيعية للغشاء السايتوبلازمي و Outer membrane للبكتريا السالبة لصبغة كرام تقود الى التغيرات غير العكسية في الايض الخلوي .

هناك مضادات اخرى تابعة لمجموعة الامينوكلايكوسيد عدا الستربتومايسين مثل Neomycin و Gentamicin و Topromycin و Amikacin و Netilmicin . تعطى جميع هذه المضادات حقنا وهي مهمة في علاج الاصابات البكتيرية خاصة ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام (يستعمل مضاد Paromomycin في العلاج الاولي ضد أصابات الاميبا في القناة المعوية).

تمتلك بعض هذه المضادات تأثيرات في بناء البروتين تختلف عن حالة الستربتومايسين. هناك موقع أرتباط قوي للرايبوسوم بمضاد كانامايسين مما يفسر تشابه مواقع الارتباط التي يجب ان تميز عن منطقة ارتباط الستربتومايسين . يرتبط مضاد Parmomycin بالاخدود الكبير (major groove) لحامض 16S rRNA . مضاد Spectinomycin يدخل ضمن مجموعة الامينوكلايكوسيد وهو مثبط للبكتريا (Bacteriostatic) وليس قاتل ، ويكون تأثيره على بناء البروتين مختلفا عن بقية مضادات الامينوكلايكوساید فهو لا يؤثر على تكوين الاصرة الببتيدية ولا على أنهاء سلسلة الببتيد انما يثبط عملية Translocation لحامض Peptidyl-tRNA من موقع A الى P وهو يرتبط بالاخدود الصغير ل 16S rRNA ويعد هذا المضاد فعالا في علاج مرض السيلان المتسبب عن بكتريا *N. gonorrhoae* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز . يعمل مضاد Neomycin-B على غلق trans − translation (وهي ظاهرة فريدة في بدائية النوة وتدعى trans –translation rescues stalled ribosome وتكون اساسية لحيوية بعض البكتريا مثل *N.gonorrhoae* وفي هذه العملية يظهر tmRNA كأول tRNA يبدء بعملية aminoacylation مع الحامض الاميني alanine) ، مضاد Neomycin-B يرتبط ب tmRNA فيصبح غير قادر على عملية aminoacylation بكفاءه مع حامض alanine بأنزيم alanyl-tRNA synthetase .

:Tetracyclines

مجموعة من المضادات واسعة الطيف فعالة ضد الركتسيا والمايكوبلازما وبعض البروتوزوا ، تمتلك تاثيرا مثبطا (Bacteriostatic) ولها فعل مباشر على عملية بناء البروتين وتثبط كلا الرايبوسومين 70S و 80S ويكون الرايبوسوم 70S أكثر حساسية لهذه المضادات.

تكون التتراسايكلينات فعاله جدا ضد بناء البروتين في الخلايا البكتيرية مقارنة بخلايا اللبائن بسبب قابلية البكتريا الحساسة لتركيز التتراسايكلين في سايتوبلازمها . تعمل التتراسيكلينات على منع amino-acyl-tRNA الحامل للحامض الأميني الجديد من الدخول للموقع Aفي الرايبوسوم لكنه يمتلك تاثيرا اقل على الارتباط بالموقع P ما عدا التراكيز العالية .

لا تعمل مضادات التتراسايكلينات على تثبيط تكوين أصرة الببتيد مباشرة او Translocation (ماعدا التراكيز العالية) كذلك يرتبط انهاء سلسلة الببتيد وتحريرها بغلق ارتباط عامل التحرر (RF) في شفرة الانهاء بموقع A.

3-4 : مثبطات تكوين الاصرة الببتيدية وخطوة Translocation :

: Chloramphenicol

مضاد واسع الطيف اكتشف من قبل Erlich سنة 1947م ، ينتج من بكتريا *Streptomyces venzuelae* وهو مثبط فعال (bacteriostatic) ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام الكروية ، أضافة الى الركتسيا والمايكوبلازما والكلاميديا .

لهذا المضاد أثار جانبية وسمية وهو يسبب فقر دم انحلالي (haemolytic anemia) ومتلازمة الطفل الرمادي (Gray baby syndrome) ، وهو يتداخل مع نضج كريات الدم الحمراء وله تاثير على رايبوسوم المايتوكوندريا ويستعمل في الحالات التي لايكون فيها هناك مضاد بديل فعال مثل أصابات التايفوئيد والسحايا المتسببه عن بكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام ، وفي حالات المرضى الحساسين للادوية الاخرى والاصابات الجلدية واصابات العيون .

يكون تاثير المضاد على الرايبوسوم 70S ولايؤثر على الرايبوسوم 80S وهو يرتبط بالوحدة 50S ويتداخل مع فعالية انزيم Peptidyl transferase وبالتالي يمنع تكوين الاصرة الببتيدية .

: Clindamycin

مضـاد نصـف مصـنع مـن مضـادات lincosamides يتكـون مـن 7-chloro-7-deoxylincomycin hydrochloride . يسـتعمل طبيـاً ضـد اصـابات بكتريـا *Staphylococcus* و *Streptococcus* وضد ممرضـات لاهوائيـة مثل *Bacteroides* وهو قليل الفعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ، يعمل على تثبيط فعالية انزيم peptidyl transferase ، اذ يرتبط بالوحدة الصغيرة 50S .

يعطى عن طريق الحقن او عن طريق الفم ويوجد بشكل غسول (Lotion) لعلاج حب الشباب . يؤثر على الفلورا الطبيعية في القناة الهضمية المعوية مما يسبب نمو البكتريا *Clostridium difficile* مما يقود الى ألتهاب Pseudomembranous colitis.

:Ketolides & Macrolides

تضـم مجموعـة Macrolides مضـادات واسـعة الطيـف تتكـون مـن حلقـة كبيـرة من Macrocyclic lacton ring مرتبطة بسكر سداسي وهناك مواقع جانبية في حلقة lacton يضاف لها جذور كيميائيه لأنتاج مشتقات لهذه المجموعة ، أصل هذه المضادات هو الارثرومايسين وهو فعال ضد البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ويكون أقل فعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام وفعال ضد المايكوبلازما والكلاميديا و *Campylobacter jejuni*.

من الأمثلة على هذه المضادات :

مضاد Azithromycin مشتق نصف مصنع له أهمية أضافية كونه فعالا ضد بكتريا *Haemophilus influenzae* المسببه لأمراض الجهاز التنفسي وبكتريا السيلان و *Borellia*.

مضاد **Ketolides like Telithromycin:** يعد من أهم المضادات الحديثة ، فعال ضد البكتريا التي أكتسبت مقاومة لمضادات الماكروليد ،بالرغم من وجود أختلاف بين الماكروليد والكيتوليد فان هذه المضادات لها نفس طريقة العمل فهي تعمل على تثبيط وظيفة الوحدة 50S للرايبوسوم وغلق سلسلة الببتيد النامية ومنع ترجمة المعلومات من mRNA بايقاف عملية Translocation ولا تثبط فعالية أنزيم Peptidyl transferase مباشرة ولاتؤثر على رايبوسوم 80S في خلايا اللبائن .

تستطيع الخلايا البكتيرية مقاومة الارثرومايسين من خلال مثيلة الموقع N-6 للادنين في 23S rRNA في الرايبوسوم وهذا الادنين يكون في بكتريا *E.coli* بالتسلسل A-2058 وفي بكتريا *Bacillus stearothermophilus* يكون A-2086 ، وفي بكتريا *B.*

subtilis يكون A-2058 ، تتم المثيلة بواسطة أنزيم N- methyltransferase . تمتلك خلايا اللبائن ومن ضمنها الانسان كوانين بدل الادنين في الموقع 2058 في 23S rRNA وهذا مهم لمنع ارتباط الماكروليد والكيتوليد برايبوسوم 80S.

مضاد Telithromycin : يرتبط بالوحدة 50S في بكتريا *Deinococcus radiodurans* ، ويمتلك هذا المضاد فعالية ضد البكتريا المقاومة للماكروليد والتي تمتلك انزيم N-dimethylase.

Streptogramins :

ينتج هذا المضاد من بكتريا *Streptomyces* وهو نوعين A و B ، النوع A هو Polyunsaturated cyclic lactones والنوع B هو Cyclic hexa depsipeptides ، تكون أهميتها الطبية قليلة ، وقد أجريت عليها تحويرات تركيبية لأنتاج مركبات أخرى مثل Dalfopristin (من نوع A) و quinupristin (نوع B) وبعد خلط هذين المضادين زاد من كفائتها في علاج أصابات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثسلين و بكتريا *Enterococcus* المقاومة للفانكومايسين ، لها تأثير تأزري في بناء البروتين، أذ تؤثر على الرايبوسوم .

تعمل مركبات نوع A على غلق amino acyl-tRNA و Peptidyl tRNA على موقع Aو P على التوالي.

تتداخل مركبات النوع B مع Peptidyl tRNA فقط في موقع P . يرتبط المركب المحور Virginiamycin M بالموقعين A و P ويعمل على مثيلة الادنين A-2058 في 23S rRNA . تحوير الموقع A-2058 أو استبداله يسبب مقاومة البكتريا للمركبات المختلفة من ضمنها الماكروليدات واللنكومايسين وستربتوكرامين نوع B.

Oxazolidinnones :

أكتشفت الفعالية ضد البكترية لهذه المركبات منذ أكثر من 20 سنه لكن بسبب سميتها العالية لم تستخدم بشكل واسع ، تم تطوير مركبات اقل سمية مثل linezolid بعد سنة 1990 ، والذي يمتلك فعالية ضد أصابات البكتيريا الموجبة لصبغة كرام مثل *S.aureus* المقاومة للمثيسلين و *Enterococcus* المقاومه للفانكومايسين ويكون فاقد الفعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام كونها تملك مضخات دفق تطرد المضاد من الخلية . يعمل هذا المضاد على تثبيط أنزيم Peptidyl transferase وهو يرتبط بالوحدة 50S ويؤثر على تكوين معقد البدء . أوضحت التجارب انه يثبط أرتباط حامض tRNA الحامل للميثيونين

بأنزيم Peptidyl transferase بالموقع p لرايبوسوم 50S ، وقد وجد ان البكتريا تقاومه عن طريق طفرات في الجينات المشفرة لحامض rRNA أذ تعمل على تغيير قاعدة G الى U في الموقع 2576 لحامض 23sRNA .

: Fusidic acid

يعد من ضمن مضادات Steroidal التي تعمل على تثبيط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام ولايعمل على البكتريا السالبة لصبغة كرام لكون جزيئات المضاد لاتستطيع اختراق سايتوبلازم الخلية وكذلك لوجود مضخات الدفق .يستخدم لمعالجة الاصابات الجلدية مثل impetigo المتسببة عن البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، ويعطى جهازياً ضد أصابات بكتريا *S.aureus* المقاومه للمثيسلين و *Enterococcus* المقاومه للفانكومايسين .يعمل على تثبيط بناء البروتين في الخلية البكتيرية أذ يثبط عملية Translocation من الموقع A الى الموقع P، كذلك يثبط عامل الاستطالة EF-G .الجدير بالذكر ان المضاد يثبط بناء البروتين على رايبوسوم 80S ، ومع ذلك يستخدم في العلاج بسبب كون المضاد لايصل الى التركيز الفعال المطلوب داخل الخلية في خلايا اللبائن ليكوّن معقد ثابت . تستطيع البكتريا مقاومته من خلال تغيير EF-G .

تمتلك البكتريا السالبة لصبغة كرام مقاومة ذاتيه لهذا المضاد بمستوى مقاومة واطئ من خلال حاجز النفاذية ،بينما تكون البكتريا الموجبة لصبغة كرام حساسة له ويمكن ان تكتسب مقاومة متواسطة بالبلازميدات من خلال تقليل دخول المضاد للخلية ويمكن ان تلعب أنزيمات نوع CATs دورا في المقاومة .

: Cyclohexamide

مركب سام ضد خلايا حقيقية النواة من ضمنها خلايا الأعفان والخمائر والبروتوزوا وخلايا اللبائن ، له تأثير ضد رايبوسوم 80S ، ويستعمل في المزارع البكتيرية للتخلص من الفطريات ويكون تأثيره متباين ضد الفطريات حسب نوعها ، تثبط رايبوسوم خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بقوة بهذا المضاد بينما تكون رايبوسوم خمائر *Kluyveromyces lactis* و *S.fragilis* مقاومة له.

الفصل الخامس

مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية

عرفت مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية منذ أستعمال أول مضاد مايكروبي في العلاج ، فقد وجد ان أكثر من 20% من سلالات بكتريا السيلان أصبحت مقاومة لمضاد السلفونومايد بعد عشر سنوات من أستعماله (سنة 1935) . وسجلت زيادة مماثلة في نسبة مقاومة مضادات السلفونومايد بين أنواع بكتريا *Streptococcus* و Coliform.

لاحظ الكسندر فلمنك سنة 1929 أن بعض البكتريا من بينها *Bacillus coli mutabile* (حاليا تدعى *E.coli*) كانت مقاومة للبنسلين .

أستعمل البنسلين في العلاج لأول مرة سنة 1941 (وبشكل تجاري سنة 1943)، كانت نسبة المقاومة له بين سلالات بكتريا *S.aureus* بحدود 1% ، وفي سنة 1947 وجد ان 38 % من سلالات هذه البكتريا أصبحت مقاومه للبنسلين ، وتصل نسبة المقاومة له في الوقت الحاضر بحدود 90%. وجد ان 43 % من أصابات هذه البكتريا خلال سنة 1999 في الولايات المتحدة الأمريكية كانت بسبب سلالات مقاومة لمضاد المثيسلين ، كذلك وجد ان مقاومة مضاد سبروفلوكساسين تصل الى 30 % في بعض الأنواع البكتيرية علما ان هذا المضاد أستعمل في العلاج سنة 1987 .

قد تكون مقاومة المضادات ذاتية (Intrinsic) او مكتسبة (acquired) ، بالنسبة للمقاومة الذاتية فهناك مضادات تكون فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما لايكون لها تأثيرا ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام وبالعكس، ترتبط هذه المقاومة مع الغشاء الخارجي (Outer membrane) الذي يكون غائبا في البكتريا الموجبة ،أذ يمنع هذا الغلاف مضادات معينة من الوصول الى موقع الهدف داخل الخلية.

المقاومة المكتسبة تحصل عندما تتحول البكتريا الحساسة الى مقاومة ، يحصل هذا عادة (ليس دائما) بعد تعرضها للمضادات ، تكون المقاومة الذاتية متواسطة بالكروموسوم بينما تحدث المقاومة المكتسبة بواسطة الطفرات في الكروموسوم أو بأكتساب جينات مشفرة للمقاومة من مصادر خارجية عن طريق البلازميدات او الترانزبوزونات .

تستعمل مضادات الحيوية على نطاق واسع في علاج المرضى الذين ثبت أو يحتمل إصابتهم بالعدوى ، أذ تسهم بحوالي 35% من الوصفات الدوائية الصادرة من مراكز الرعاية الصحية، أضافة لكونها تستعمل في علاج الحيوانات ومحفزات لنمو الحيوانات في الزراعة، أذ تستعمل ملايين الباوندات (Pounds) من المضادات سنويا (تقريبا 3 مليون باوند) ، من جانب أخر فأن جزء من المضادات تفرز بدون تغيير من الأنسان والحيوان لذا فان كميات كبيرة من المضادات تدخل المجاري (Sewage) ومن خلالها يمكن ان تصل الى الأنهار والبحيرات وبذلك يتعرض عدد هائل من الخلايا البكتيرية لحجم كبير من المضادات سنويا ، أي ان المضادات تكون منتشرة بشكل واسع في البيئة ، وتبين الدراسات ان للبيئة دور في تطور مقاومة البكتريا للمضادات نتيجة تعرضها لها .

في دراسة أجراها فريق المسح الجيولوجي في أمريكا حديثا وجد ان 22 % من نماذج مياه الجداول والأنهار تحوي كميات من مضادات الحيوية ، علما ان البكتريا يمكن ان تطور المقاومة حتى أذا تعرضت لمستويات واطئة من المضادات .

إن الإكثار من استعمال مضادات الحيوية لا يؤدي فقط إلى مجرد مقاومة البكتريا لنفس المضاد الحيوي بل يمتد الأمر ليشمل قائمة المضادات من نفس الفئة أو المجموعة، ويعد سوء

استعمال مضادات الحيوية أمراً مكلفاً أذ أنه يؤدي إلى أن تصبح الميكروبات الموجودة في بيئة المستشفيات مقاومةً لمضادات الحيوية. و ينتج عن ذلك أيضاً أن يصبح بعض المرضى حاضنين لمستعمرات الميكروبات المقاومة لمضادات الحيوية والتي تمثل مصدراً لانتقال العدوى إلى مجموعة أخرى من المرضى داخل المستشفيات، وحينما تنتشر عدوى الميكروبات المقاومة لمضادات الحيوية ترتفع آنذاك نسبة الوفيات، خاصة بين المرضى المصابين بأمراض أخرى تؤثر في مناعتهم أو المصابين بفشل في وظائف الكثير من أعضاء الجسم. ويعد العامل المؤثر على انتشار الميكروبات المقاومة لمضادات الحيوية هو سوء استعمال تلك العقاقير في المستشفيات أو على مستوى الأفراد.
بالرغم من التطور العلمي في أيجاد مضادات جديدة الأ أن الصراع يبقى مستمرا نتيجة لظهور سلالات بكتيرية مقاومة الأمر الذي يتطلب ستراتيجيات جديدة لمنع أو تأخير تطور المقاومة البكتيرية ، أحد هذه الطرق البسيطة للسيطرة على أنتشار السلالات البكتيرية المقاومة هي أجراءات السيطرة البسيطة مثل عزل المريض المصاب بالسلاله المقاومة وضرورة أهتمام الكادر الصحي بنظافة وغسل الأيدي بالمعقمات والتخلص من فضلات المريض بشكل صحي ، الجانب الأخر هو الدقة في وصف المضادات وضرورة التمييز بين الأصابات البكتيرية والفايروسية لتجنب الأستعمال غير الضروري للمضادات التي تؤدي الى نشوء المقاومة.

طورت البكتريا آليات مختلفة للتخلص من تاثير مضادات الحيوية ويمكن تلخيص هذه الاليات كالاتي:

1- أمتلاك حاجز النفاذية (Permeability barrier)

تكون هذه الألية من المقاومة خاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام اذ تحصل تغيرات في الغشاء الخارجي (Outer membrane (OM)) الذي يغلف الخلية البكتيرية ، يحوي هذا الغشاء على قنوات بروتينية تدعى البورينات (porines) وهي قنوات تسمح بمرور المواد ذات الاوزان الجزيئية اقل من 600 دالتون بشكل أنتقائي من خارج الخلية الى الفسحة البربلازمية (Periplasmic space) وبالعكس.توجد أنواع من هذه البورينات عرف منها في البداية :

Outer membrane protein F (Omp F) و **Outer membrane proteinC** (Omp C)

يعد البورين العام Omp F في بكتريا *E.coli* أول بروتين غشائي تم دراسته بشكل دقيق بواسطة الاشعة السينية وهو متماثل مع بورينين أخرين هما OmpF و PhoE .

تستطيع مضادات الحيوية الذائبة بالماء من المرور خلال القنوات العامة مثل مضادات البيتالاكتام وكمثال عليها الامبينيم الذي ينتشر خلال قنوات خاصة قاعدية هي Opr D في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* . يكون أنتشار الجزيئة المحبة للدهون اكثر صعوبة خلال قنوات البورين. يكون بورين Opr F ذا انتشار محدد 1% تقريبا من انتشار قنوات G-veالاخرى.

بورين MspA ذو فعالية عالية وهو موجود في بكتريا *Mycobacterium smegmatis* واكتشف حديثا بورين MspA ذو تركيب ثماني متجانس له قناة مركزية مفردة تسمح بمرور مركبات Isoniazed و Pyrizinamid و Ethambutol ومغذيات صغيرة ذائبة بالماء.

البورين في بكتريا *E.coli* O157:H7 يمنحها مقاومة ذاتيه لمضادات الستربتومايسين والسلفونومايد والتتراسايكلين . تحصل المقاومه للمضادات من خلال تقليل عدد قنوات البورينات او جعل اقطارها ضيقة جدا بحيث تمنع دخول المضاد من دخول الخلية وتعد هذه المقاومة من أخطر الانواع فعند حصول تغير في القنوات البروتينية فسوف يتم منع اكثر من نوع من مضادات الحيوية من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية اي تكون المقاومه عامه ومشتركة

توجد عوامل أضافية في بعض السلالات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام تمنح المقاومة لمدى واسع من مضادات الحيوية هي مضخات الدفق(**Multidrug efflux pumps**) (سيتم تفصيلها في الفقرة 4) فهي تمنح المقاومه لمضادات البيتالاكتام والتتراسايكلين والكلورمفينيكول والماكروليد والكوينولون اضافة الى بعض Antiseptic ولها القدرة على طرد مدى واسع من المركبات الكيمياوية السامة خارج الخلايا ، وقد اكتشف في السنوات الاخيرة مضخات دفق في الفطريات والبروتوزوا وحتى في خلايا اللبائن.

تنتشر المواد المحبة للماء خلال القنوات البورينية أما المركبات المحبة للدهون فتنتشر خلال طبقات الدهون :

من الامثلة على ذلك:

مركب D-cycloserine:

ينتقل عبر الاغشية السايتوبلازمية البكتيرية بواسطة أنزيم alanine permease ويدخل لسايتوبلازم بكتريا *Streptococcus faecalis* ويثبط تنافسيا بحامض alanine لانه يشبه بتركيبه D-alanine .

مركب fosfomycin (Phosphonomycin):

يحتوي في تركيبه على الفسفور ويثبط تنافسيا بالتراكيز العالية لـ α-glycerophosphate.

Tetracycline:

يعبر غشاء البكتريا السالبة لصبغة كرام خلال قنوات البورينات OmpF و OmpC ، تظهر الخلايا الطافرة لبورين OmpF مقاومة للتتراسايكلين.

يعبر مضاد Minocycline طبقات الدهون وليس من خلال البورينات. يرتبط التتراسايكلين مع أيونات mg^{+2} ويكون معقد Tetracycline - mg^{+2} ذو شحنة موجبة يتجمع في الفسحة البربلازمية للبكتريا في الخلايا السالبة لصبغة كرام.

Quinolones:

تنتشر مضادات الكوينولون خلال الاغشية الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام كجزيئات مشحونه خلال قنوات البورين ويكون تركيز المضاد في الفسحة البربلازمية أعلى منه في الوسط الخارجي مما يوضح سبب كون بعض الكوينولونات أكثر فعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بالموجبة لصبغة كرام اذ ان الاخيرة لاتمتلك فسحة بربلازمية .

Aminoglycosides:

تكون هذه المضادات ذائبة بالماء تنتقل بالتداخل بين مجموعة quanidino ذات الشحنة الموجبة بمركز المضاد مع مجموعة anionic في L.P.S في غلاف البكتريا، يحصل بعدها تجمع للمضاد في الفسحة البربلازمية يتبعه اختراق بطيء معتمد على الطاقة الى داخل السايتوبلازم بعد 15-30 دقيقة بعملية الامتصاص ذاتي التعزيز (self promoted uptake) بعدها تبدء مرحلة أخرى هي التراكم داخل الخلوي (المعتمد على الطاقة) للمضاد . يمكن ان يتحرر المضاد من الخلية عند تحطم غشائها بالمذيبات العضوية مثل toluene ، أثبتت الدراسات الحديثة ان المضادات الامينوكلايكوسيدية لها مضخات دفق متخصصة في بعض البكتريا .

2- التثبيط الأنزيمي لمضادات الحيوية

تستطيع بعض الانواع البكتيرية مقاومة مضادات الحيوية من خلال انتاجها انزيمات محورة أو محطمة للمضاد ومن هذه الانزيمات:

(1-2) الانزيمات المحطمة لمضادات البيتالاكتام:

تستطيع العديد من الانواع البكتيرية أنتاج أنزيمات تعمل على تحطيم مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربينيم (Carbapenems) وتدعى هذه الانزيمات بانزيمات البيتالاكتاميز (β-lactamases).

تعمل هذه ألأنزيمات على كسر أصرة الامايد في حلقة البيتالاكتام الموجودة في مضادات البيتالاكتام لتحويلها الى المركبات فاقدة الفاعلية (حامض Pencillonic acid الناتج من تحطم البنسلينات و Cephallosporonic acid الناتج من تحطم السيفالوسبورينات).

هناك اعداد كثيرة وانواع مختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز فيوجد على الاقل 340 انزيم بيتالاكتاميز بكتيري مختلف تم وصفها مما يجعل من تصنيفها امرا صعبا.

هناك نظامين لتصنيفها:

تصنيف Ambler الذي يعتمد على التشابه في تتابع الاحماض الامينية ونظام **Bush-Jacoby-Medeiros** الذي يعتمد على نسق المثبط – المادة الاساس .

هناك أربع أصناف حسب تصنيف Ambler:

صنف A: وهي أنزيمات البنسلينيز (Pencillinases) والسيفالوسبورينيز (Cephalosporinases) التي تشفر بالبلازميدات او بالقافزات (الترانزبوزونات).

صنف B: وهي أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه (metallo β-lactamase)

صنف C: وهي سيفالوسبورينيز كروموسومية

صنفD: وهي Oxacillinases

أنزيمات صنف A تعد أكثرها شيوعا ثم أنزيمات صنف C .

اما تصنيف **Bush–Jacoby-Medeiros** فهو كذلك يضم أربع أصناف أو مجموعات هي:

المجموعة1 السيفالوسبورينيز المشفرة كروموسوميا والتي تكون ضعيفة التثبيط بحامض الكلافيولونيك.

المجموعة 2 البنسلينيزوالسيفالوسبورينيز والانزيمات واسعة التخصص التي تتضمن Carbapenemases سواء المشفر بلازميديا او كروموسوميا والتي تثبط الكلافيولونيك ومثبطات اخرى للبيتالاكتاميز.

المجموعة 3 metalloβ-lactamases : وهي أنزيمات لا تتاثر بجميع مثبطات البيتالاكتاميز

المجموعة 4 تضم عددا محدودا من أنزيمات البنسلينيز غير الموصوفة التي لا تثبط بحامض الكلافيولونك.

أكتشفت كذلك أنزيمات TP47 في بكتريا *Treponema palladium*.

1-1-2: أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام

أغلب هذه الانزيمات المهمة هي تلك المنتجة من البكتريا *S.aureus* والتي تكون مسؤولة عن مقاومة هذه البكتريا للبنسلين وقد سجلت مثل هذه العزلات اول مره في نهاية عقد 1940 وبداية 1950 . تسجل في الوقت الحاضر في المستشفيات اكثر من 90 % من عزلات هذه البكتريا مقاومة للبنسلينات بسبب أنزيمات البيتالاكتاميز. تكون أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من هذه البكتريا محفزة ويكون أنتاج الانزيم واطىء جدا في غياب البنسلين والسيفالوسبورين، وعند أضافة كميات من المضاد (بحدود 0.0024 مايكروغرام\مل وسط) فأن أنتاج الانزيم يزداد ، تشكل هذه الانزيمات 3 % من البروتين الكلي المنتج من البكتريا.تعتمد مقاومة بكتريا *S.aureus* للبنسلين على حجم اللقاح ،وتكون الجينات التنظيمية التي تسيطر على تعبير بروتين البيتالاكتاميز نوع Bla P (يدعى Bla Z في بكتريا *S.aureus*) هي جينات *bla1* و *blaR1* و *blaR2* . يعمل بروتين Bla1 المشفر بجين *bla1* على تثبيط الارتباط بموقع المشغل (Operator) بين *bla* 1 و *bla* PZ وبالتالي يمنع تعبير أنزيمات البيتالاكتاميز.

2-1-2 أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من البكتريا السالبة لصبغة كرام

تنتج معظم انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام أنزيمات البيتالاكتاميز خاصة الانواع التابعة للعائلة المعوية ، بدءت مقاومة هذه البكتريا من خلال انزيمات البيتالاكتاميز بالظهور مترافقة مع ظهور مشتقات البنسلين مثل الامبسلين واستخدامها في العلاج .تكون بعض هذه الانزيمات غير محفزة اي تنظيمية (Constitutively) كما في حالة الانزيمات المنتجه من بكتريا

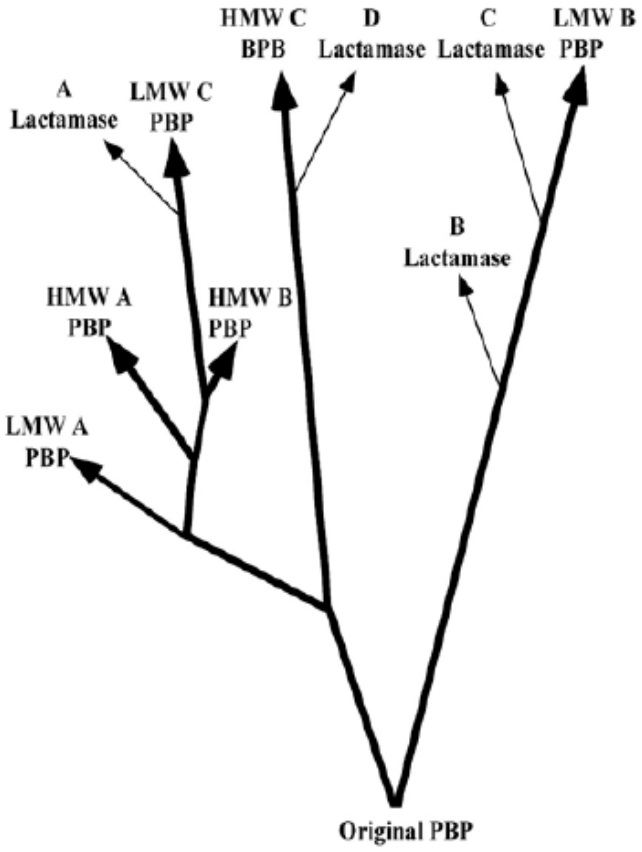
E.coli أذ تشفر بجين *ampC* الكروموسومي الذي يعبر تنظيميا بمستوى واطىء وتشاهد الطفرات في هذا الجين بتكرار واطىء ، وتزيد التغيرات الوراثية الناتجة عن الطفرات النقطية من أستنساخ جين *ampC* . يكون الأنزيم في بعض الانواع الاخرى مثل *Enterobacter cloacae* و *Citrobacter freundi* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia marcescens* مستحثا (*inducible*) . يسيطر على تعبير جين *ampC* في هذه الانواع بجين *ampR* . يعمل انزيم البيتالاكتاميز صنف C (AmpC) على تحليل مضادات السيفوتاكسيم والسيفبيم والسفبيروم ، ويشفر له بجين *amp*C وهذا الجين يمكن ان يكون بلازميدي، فقد وجد انه محمول على بلازميد اقتراني في بكتريا *Klebsiella spp.* . تم عزل طفرات من بكتريا *Serratia marcescens* منتجه لأنزيم AmpC محور يجعل السلالة مقاومة جداً للسفتازديم والسفيبيم والسفبيروم، وهذا يقود للاستنتاج بان زيادة استعمال سيفالوسبورينات واسعة الطيف يؤدي الى أنتخاب طفرات منتجة لانزيمات AmpC محورة ، وهذا يصبح مشابها لما تسبب في أنتاج بعض أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESßLs)من انزيمات TEM و SHV. يتداخل بروتين Amp R المشفر بجين *ampR* مع بناء الببتيدوكلايكان.

تعود أنزيمات TEM لمجموعة البيتالاكتاميز صنف A والتي تمتلك القدرة على تحليل المضادات الحاوية على حلقة البيتالاكتام الثابتة مثل السفتازديم والسيفوتاكسيم والازتريونام وعلى الاغلب فهي بلازميدية المنشأ ومن أهمها بلازميد R-TEM-1 الذي يمتاز بقابليته على الانتقال الذاتي، وهي تنتقل من جنس الى اخر بين افراد العائلة المعوية ، من جانب اخر هناك انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية (metalloβ- lactamases) والتي تقع تحت صنف B مثل IMP-1 الذي يحتاج لايون الزنك Zn^{+2} ، وقد يكون كروموسومي او بلازميدي المنشا وهو يمنح مقاومة لمضاد الامبينيم ومضادات الكاربينيم الأخرى.

تقع انزيمات البيتالاكتاميز على السطح الخارجي للغشاء السايتوبلازمي في الفسحة البربلازمية في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، اذ تكون كمية الأنزيم المنتجة قليلة ومحتجزة في الفسحة البربلازمية وتعمل على أعاقة مرور جزيئات المضاد الحيوي الى الداخل فتنشأ المقاومة من الموقع الستراتيجي لهذه الانزيمات بين الغشاء الخارجي وموقع هدف المضاد (PBPs) فتتمكن بذلك الانزيمات من تحطيم المضاد عند دخوله منطقة الفسحة البربلازمية لذا فان تراكيز قليلة منه تكون كفيله بحماية البكتريا من تاثير المضاد البكتيري . كانت مضادات Methecillin و Cloxacillin تعد كمادة أساس ضعيفة لانزيمات البيتالاكتاميز، وتكون الفة مضاد المثيسلين لانزيم البيتالاكتاميز المنتج من بكتريا *S.aureus* اقل بكثير من مضاد benzyl pencillinوبذلك يتحطم بصورة اقل من مضاد benzyl pencillin الا انه غير فعال ضد

أصابات البكتريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بمضاد benzyl pencillin .تكون أنزيمات البيتالاكتاميز صنف D فعالة ضد مضادات Cloxacillin و Oxacillin وهي تضم 50 نوع أشهرها OXA-16 و OXA-15 و OXA-14 و OXA-18.

يكون عمل أنزيمات البيتالاكتاميز مشابه لأنزيم transpeptidase ، هناك عدة مراحل في تطور أنزيمات PBPs أذ تحولت من endotranspeptidase الى أنزيمات البيتالاكتاميز بتغيير في موقع الهدف ، كذلك تعرف هذه الأنزيمات ب d,d –hydrolyases او d,d- Carboxy peptidases ، تشير الدراسات التطورية للأحماض الأمينية الى ان جميع أنزيمات البيتالاكتاميز تنحدر من PBP واحد ، كذلك تشير الدراسات الى ان أنزيمات البيتالاكتاميز موجودة في البكتريا قبل وقت العالم Fleming .



شكل 47: الشجرة التطورية لبروتينات PBPs وأنزيمات البيتالاكتاميز.

(2-1-3) أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف
(ESßLs) Extended spectrum β-lactamases

أدى الاستخدام الواسع لمضادات سيفالوسبورينات الجيل الثالث في المجال الطبي العملي منذ سنة 1980 الى احداث تغييرات في أنزيمات البيتالاكتاميز وظهور أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESßLs) والتي تعد من الاسباب المهمة التي ساعدت البكتريا على مقاومة مضادات البيتالاكتام الحديثة .

تنتج أغلب انزيمات ESßLs عن طريق حدوث طفرات في الجينات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز نوع TEM و SHV مؤدية الى تغيير في ترتيب الاحماض الامينية للموقع الفعال للأنزيم.

من الامثلة على ذلك انزيم TEM-12 و TEM-2 الذي يستبدل فيه حامضين امينيين هما Serine بدل Arginine في الموقع 164 و Lysine بدل glutamate بالموقع 104 وتؤدي هذه التغيرات الى تحليل مضادات ذات اهمية كبيرة مثل السفتازديم والسفيوركسيم.

تحوي مضادات Carbapenemes على ذرة كبريت في حلقة البيتالاكتام تستبدل بذرة كاربون مثالها Thienamycin و Meropenem ، وتكون فعالة بصوره جيدة ضد البكتريا المنتجة لاشكال مختلفة من أنزيمات TEM. أتضح بعد ذلك ان هذه المضادات تتحلل ببعض أنزيمات ESßLs وأنزيمات metallo β- lactamases .

أرتبطت مقاومة مضادات Methicillin و Oxacillin مع ظهور أنزيمات ESßLs . وقد ظهرت منذ أواسط عقد الستينيات من القرن الماضي بلازميدات جديدة مشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز في البكتريا السالبة لصبغة كرام.

من الأمثلة على هذه الأنزيمات Imi-1 و Per-1 و Sme-1 و Toho-1 و Nmc-A ، وأكتشف أنزيم IRT(Inhibitor-resistant TEM) أول مرة في فرنسا وبريطانيا سنة 1992.

من أكثر انزيمات ESßLs شيوعا في الوقت الحاضر أنزيمات CTX-M وهي واسعة الطيف وفعالة بشكل كبير ضد مضادات السيفوتاكسيم والسفتازديم يشفر لها من قبل جين *bla* ctx-M المحمول على بلازميد اقتراني كبير الحجم ينتقل بين الاجناس المختلفة لبكتريا العائلة المعوية وهناك انماط من هذه الانزيمات اكثرها شيوعا CTX-M15 ثم CTX-M16 ثم CTX-M8 ثم CTX-M14 على حسب بعض الدراسات سنة 2007 على بكتريا *Enterobacter* و *E.coli* و *Proteus mirabilis* .

(2-2): الأنزيمات المثبطة لمضاد الكلورمفنيكول

يعمل انزيم Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) على تحوير مضاد الكلورمفنيكول الى مركب 3-Acetoxy chloramphenicol فاقد الفعالية والقابلية للارتباط مع الرايبوسوم. يشفر لأنزيم CAT في معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام جين موجود على بلازميد او ترانزبوزون Tn9 . تحفزالجينات المشفرة لأنزيم CAT في البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Bacillus spp* و *Staphylococcus spp* بوجود الكلورمفينيكول وتتضمن فعالية التحفيز تنشيط ترجمة mRNA لانتاج الانزيم، ويكون بناء أنزيم CAT تنظيمي في أغلب البكتريا السالبة لصبغة كرام ، في بكتريا *E.coli* يقع تحت سيطرة ميكانيكية الكبح (catabolite repression) ويكون بناء الانزيم سريع في المزارع النامية على الكليسرول مقارنة بالمزارع النامية على الكلوكوز ، يتم أستنساخ جين *cat* عند ازدياد مستوىcAMP حسب نسبة الكلوكوز وبالتالي يرتبط معقد CAP-cAMP بمنطقة الحفاز (Promotor) ويتم أرتباط أنزيم RNA Polymerase مع الجين التركيبي ليتم الاستنساخ .

(3-2) الأنزيمات المثبطة لمضادات الامينوكلايكوسيد

تعود مقاومة البكتريا لمضادت الامينوكلايكوسيد الى حدوث طفرات تغير في الرايبوسوم وكذلك بأمتلاك حاجز النفاذية ، الا ان من أهم أسباب المقاومة هي التثبيط الانزيمي للمضاد. هناك اكثر من 50 انزيم تعمل على تثبيط هذه المجموعة من المضادات يمكن جمعها تحت ثلاث مجاميع رئيسية هي :

1) المجموعة الاولى تقوم بعملية N-acetylation لمجموعة الامين باستعمال co Acetyl enzyme A كمانح للأستيل ، مثال لهذه المجموعة أنزيم N-acetyl transferase .
2) مجموعة تقوم بعملية O-Adenylation تتضمن أنتقال AMP من ATP الى مجموعة الهيدروكسيل وهي تضيف Adenyl ، مثل أنزيم O-adenyl transferase.
3) مجموعة تحفز عملية الفسفرة بأضافة مجموعة فوسفات الى جزيئة المضاد لعملية O-phosphorylation ، مثل أنزيم Phosphotransferase .

تحصل لمضاد الستربتومايسين عملية Adenylation و phosphorylation لكن لايحصل له acetylation ، يكون أنزيم N-acetyl transferase متخصص لمجاميع amino لمضادات أمينوكلايكوساید اخرى في مواقع 1 و 3 و $^{-}6$ و $^{-}2$

يهاجم أنزيم O- adenyl transferase مجاميع الهيدروكسيل في المواقع $^{-}2$ و $^{-}3$ و 4 ، أما أنزيم O- phosphoryl transferase فيهاجم مجاميع oH في الموقع $^{-}3$ و $^{-}3$ و 4 .

يكون الموقع الخلوي للانزيمات المحورة للامينوكلايكوسايد غير معروف بالضبط لكن يعتقد ان السايتوبلازم هو الموقع الذي تعمل فيه هذه الانزيمات على المضادات .

صممت مضادات الامينوكلايكوسيدات نصف المصنعة ضد الفعل التثبيطي للانزيمات فقد تم تطوير مضادات Tobromycin و Netilmicin و Amikacin لتقاوم أنزيمات O-phospho transferases لكنها حساسة لانزيم N-acetyl transferase.

التثبيط المتخصص لأنزيم O-phospho transferases يكون كفوء لان هناك بعض التشابه بالتركيب بين هذه الانزيمات وأنزيم protein phosphorylating kinases في خلايا حقيقية النواة.

تمنح أنزيمات Acetyl transferases المشفرة بجينات كروموسومية مقاومة ذاتيه في السلالات التي توجد فيها ، مثالها أنزيم AAC(2^{--})-Ia في بكتريا *Providincia stuartii* والذي يلعب دور في عملية Acetylation لطبقة الببتيدوكلايكان ، وقد أظهرت الدراسات ان له دور في تنظيم شكل الخلية ، ويكون لأنزيم AAC(2^{--})-Id في بكتريا *Mycobacterium smegmatis* دور في مقاومة فعل انزيم Lysozyme أي ان له وظيفة تتعلق بجدار الخلية .أكتشف حديثا أنزيم AAC(6^{--})-Iy في بكتريا *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* السلاله Enteritidis يلعب دور في أيض السكريات .

هناك أنواع أخرى تابعة لأنزيمات Acetyl transferases كروموسومية الأصل مثل: AAC(6^{--})-IC في بكتريا *Serratia marcescens* و AAC(6^{--})-Ig في بكتريا *Acinetobacter haemolyticus* و AAC(6^{--})-Ij في بكتريا *Acinetobacter sp.*13 و AAC(6^{--})-Ik في بكتريا *Acinetobacter sp.*6 .

(4-2) الأنزيمات المثبطة لمضادات Streptogramins

تعطى هذه المركبات مثل dalfopristin (مجموعة A) خلطا مع quinupristin (مجموعة B) ليكون لها تاثيرا تأزريا جيدا ضد البكتريا ، يكون هذا الخلط فعال ضد الممرضات المهمة مثل *S.aureus* ذات المقاومة المتعددة و *Enterococcus faecium* المقاومة للفانكومايسين. تنتج مقاومة البكتريا الموجبه لصبغة كرام لمركبات مجموعة A عن عملية O-

Acetylation لمجموعة الهيدروكسيل للمضاد بواسطة أنزيم O-acetyl transferase المشفر ببلازميد يحمل جين *vat* . أما مجموعة B فانها تثبط بأنزيم hydrolase .

3- تحوير الموقع الهدف لعمل المضاد

3-1: مقاومة مضادات البيتالاكتام

من الطرق الاخرى لمقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام هي تغيير موقع هدف المضاد وهي أنزيمات PBPs المخصصة لأرتباط هذه المضادات فيصبح المضاد غير فعال ، وتوجد هذه المقاومة في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

تشفر جينات mosaic لأنزيمات PBPs هجينة تقلل الألفة للبيتالاكتام في بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين (MRSA) ، تمتلك سلالات MRSA القابلية على الأستيطان عند المرضى الراقدين في المستشفى والكادر الطبي . تنشأ المقاومة عن طريق أكتساب جين محمول على ترانزبوزون هو *mecA* الذي يشفر لأنزيمات PBPs جديدة ($PBP2^-$ لتمييزها عن PBP2a) لها ألفه قليلة جدا لجميع مضادات البيتالاكتام ،وفي غياب المثيسلين يتم تثبيط بناء بروتين Mec R1 . تسمح الطفرات في منطقة *mec1* ببناء MecR1 و $PBP2^-$ مؤدية الى نشوء مستويات عالية من مقاومة المثسلين .هناك تماثل في تتابع القواعد النتروجينية لجينات *mecR1* و *mec1* مع جينات *bla1* و *blaR1* التي تنظم بناء أنزيمات البيتالاكتاميز في البكتريا الموجبة لصبغة كرام .

سجل في سنة 1999 وفاة أربع أشخاص بينهم فتاة بعمر 13 سنة كانت تعاني من صعوبة بالتنفس وسعال وحمى عالية عولجت في البداية بمضادات السيفالوسبورين لكنها لم تستجيب للعلاج فأستعمل مضاد الفانكومايسين الأ انها توفيت بعد سبع أيام من دخولها للمستشفى وقد وجد انها مصابة بسلالات MRSA.

توجد في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* خمس أنواع من PBPs ذات وزن جزيئي عالي هي 1(1a و 1b) و 2 (2a و 2b و 2x) تكون ضرورية لحياة الخلية ،ووجد أن تغير حامض أميني واحد في PBP واحد يقود الى نشوء مقاومة بمستوى واطئ لمضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات ، وقد حدثت المستويات العاليه للمقاومة في العزلات المرضية لهذه البكتريا من خلال تغيير في أربع أحماض امينية في PBP2x من خلال طفرات متعددة قللت ألألفة للمضاد.

3-2: مقاومة مضادات الماكروليد

تقاوم معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام مضاد الارثرومايسين بأمتلاكها جين بلازميدي *erm* (*ermA* و *ermB* و *ermC*) يشفر لأنزيمات N-methyl transferase او methylase كما في بكتريا *S.aureus* و *Streptococcus spp* . تعمل هذه الانزيمات على مثيلة الأدنين في 23 S rRNA في الرايبوسوم ، ويتم مثيلة هذا الجزء من الرايبوسوم وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة لفعل المضاد أذ تمنعه من الأرتباط بالوحدة الفرعية 50 S ، يوجد N-dimethylated adenine في 23 S rRNA في سلالات *S.aureus* الحاوية جين *erm* المقاومة للأرثرومايسين ، بينما لا يوجد ذلك في سلالات الطراز البري في البكتريا الحساسة للارثرومايسين ، توجد ميكانيكية المقاومة هذه ضد مضادات Macrolids و Lincosamides و Streptogramins التي يختصر لها MLS . يمنح جين *msrA* في بكتريا *S.aureus* مقاومة ضد مضادات Macrolids و Streptogramins لكن لا يمنح مقاومة ضد Lincosamides.

3-3: مقاومة مضادات الكوينولون

يكون موقع الهدف لهذه المضادات هو الانزيم Topoisomerase II (DNA gyrase) فيمكن ان تحصل طفرات في جينات *par* C و *gyr* A المشفرة للأنزيمات أعلاه مما يجعل البكتريا مقاومة لفعل مضادات الكوينولون. تقع المنطقة المتخصصة لمقاومة الكوينولون (QRDR) بين الحامض الاميني رقم 67 و 107 لوحدة Gyr A في بكتريا *E.coli* الحامض الاميني رقم 83 يكون serine هو المهم جدا لتداخل الانزيم مع المضاد ،

في بكتريا *Campylobacter jejuni* و *Klebsiella pneumonia* و *Ps. aeruginosa* يكون حامض Threonine في الموقع 83 بدل serine وتكون هذه البكتريا مقاومة جدا للكوينولونات.

بعد دراسة تتابع القواعد النايتروجينية لجينات بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* و *Helicobacter pylori* و *Treponema pallidium* وجد غياب الجينات المسؤولة عن وحدات Topoisomerase IV .

تعتمد أحدى الميكانيكيات التي أكتشفت حديثا على أخفاء مؤقت لموقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد ، على سبيل المثال تستطيع بكتريا السل في بعض الحالات مقاومة مضادات الكوينولون من خلال وجود بروتين يعمل على أخفاء الموقع الفعال لأنزيم Topoisomerase ، هذا البروتين المقاوم يشبه من الناحية الكيمياوية والشكل والحجم المادة الأساس التي يعمل عليها هذا

الأنزيم (منطقة معينة من DNA) وعند أرتباط أنزيم Topoisomerase بهذا البروتين يمنع المضاد من الوصول والتأثير على الأنزيم الهدف.

هناك بروتينات تشفر بلازميديا تدعى Qnr تتداخل مع أنزيمات DNA gyrase تقلل فعل مضادات الكوينولون ، ثلاث منها هي Qnr A و Qnr B و Qnr S أضافه الى بروتينات أضافيه هي (Qnr A1 و Qnr A2 ... الخ) تحت كل بروتين . يوجد الجين المشفر لبروتين Qnr A على الكروموسوم في *Shewanella algae* الموجوده في المياه ، أما الجينات الأخرى ذات العلاقة موجودة ضمن جينوم بكتريا *Photobacterium profundum* و *Vibrio parahemolytica* و *V.vulnificus* الموجودة في المياه أيضا.

يوجد البلازميد المشفر لبروتينات Qnr A و Qnr B في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *E.coli* و *Enterobacter spp.* ويكون من البلازميدات ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية. وقد توجد الجينات المشفرة لبروتينات Qnr A و Qnr B على انتكرون النوع الأول. يوجد الجين *qnrS* في بكتريا *Shigella spp* و *Salmonella spp*.

4-3: مقاومة مضادات ألأمينوكلايكوساید

تحصل طفرات في موقع الهدف 30S للرايبوسوم مما يسبب فقدان فعالية هذه المضادات . عند دراسة تتابع DNA في العزلات المرضية لبكتريا السل المقاومة لمضاد الستربتومايسين وجد ان 70% منها تمتلك طفرات في جين *rpsL* المشفر لبروتين S12 الذي يرتبط به الستربتومايسين في الوحدة 30S ، وهذه الطفرات تسبب أستبدال Lysine عند الموقع 43 او عند الموقع 88 بحامض الارجينين وبالتالي فقدان أرتباط المضاد بالرايبوسوم . توجد هذه المقاومة الرايبوسومية كذلك في بكتريا أخرى مثل *Nessieria gonorrhoae* و *S.aureus* و *Streptococcus faecalis* . بينت الدراسات الحديثة ان هناك ميكانيكية اخرى لحماية الرايبوسوم ضد بعض مضادات الامينوكلايكوساید هي من خلال انزيم يشفر له بلازميديا يعمل على المثيلة في الموقع A في 16S rRNA هو quanine كما في بكتريا *Ps. aeruginosa* و *Serratia marcescens* مما يجعل البكتريا مقاومة لمضادات Tobramycin و Amikacin.

أكتشفت عملية مثيلة 16S rRNA أولا في الأكتينومايسيتات المنتجة لمضادات الأمينوكلايكوسيد مثل *Micromonospora purpurea* المنتجة لمضاد جنتامايسين و *Streptomyces tenabrius* المنتجة للتوبرومايسين مما يمنحها مقاومة عاليه لهذه المضادات (MIC أعلى من 500 مايكروغرام /مل) ، بعد ذلك وجدت هذه الميكانيكية في البكتريا المرضية المقاومة للأمينوكلايكوسيد .

استعمل مضاد الستربتومايسين لعلاج بكتريا السل كعلاج ناجح و متوفر في البداية ، لكن بعد سنة واحدة من العلاج وجد أن 40 % من سلالات هذه البكتريا أصبحت مقاومة للستربتومايسين بفعل الطفرات الوراثية والتي تحدث بواقع مرة لكل 100 مليون مرة تنقسم فيها بكتريا السل ، يمكن أن يحمل الشخص المصاب ما يقرب من مليار خلية بكتيرية وبالتالي فأن فرصة 10 خلايا بكتيرية ستكون مقاومة للمضاد وبالتالي تتكاثر وتصبح سائدة على البكتريا الحساسة للستربتومايسين.

3-5: مقاومة مضادات الريفامبسين

تكون الطفرات في الوحدة الفرعية β للانزيم الهدف RNA Polymerase هي المسؤولة عن فقدان حساسية البكتريا للريفامبسين، يتم في معظم العزلات المرضية لبكتريا السل أستبدال حامض serine (موقع531) او histidine (عند موقع 526) تحت سيطرة جين *rpoB* الذي يشفر للوحدة الفرعية β . تعمل الطفرات على أن يكون الريفامبسين غير مؤثر في نمو بكتريا السل بينما تكون المقاومة في بكتريا *E.coli* للريفامبسين من خلال نموها البطيء ويكون السبب غير معروف لكن قد يكون مرتبطا بطبيعة النمو البطئ لبكتريا السل مقارنة ببكتريا *E.coli* .

3-6: مقاومة مضادات السلفونومايد

:Trimethoprime

يوجد في البكتريا السالبة لصبغة كرام 16 جين مسؤوله عن أنزيم Dihydrofolate reductase (DHFR) وهو موقع عمل مضاد Trimethoprime ، معظم هذه الجينات بلازميدية الأصل بالرغم من كونها قد ترتبط بالكروموسوم بشكل مؤقت لأنها مرتبطه بالقافزات (الترانزبوزونات).

يشفر الجين *dhfr1* لأنزيم DHFR في البكتريا السالبة لصبغة كرام وهو يقع على Cassete متحرك مرتبط مع ترانزبوزون Tn7 وقد ينغرز في الكروموسوم في بعض الانواع البكتيرية . تنتج البكتريا المقاومة للترايثموبرايم أنزيمات DHFRs محورة بشكل عالي ، على سبيل المثال تنتج بكتريا *E.coli* المقاومة لهذا المضاد 100 ضعف من الانزيم وبالتالي تكون مقاومة 3 أضعاف اكثر مقارنة بالأنزيم للطراز البري.

وتنتج بكتريا *Haemophilus influnzae* المقاومه للترايمثوبرم أنزيم DHFRs عالي فتكون هذه السلالة مقاومة للمضاد بشكل أكثر. في كلا الحالتين تكون الطفرات في تتابعات الحفاز (Promoter) المسيطره على تعبير الجينات التركيبية .

Sulphonomide :

تحصل مقاومة هذا المضاد عن طريق الطفرات التي تحصل في الجين الكروموسومي *dhps* المسؤول عن أنزيم Dihydro pteroic acid synthetase (DHPS) او بأكتساب جين بلازميدي الاصل مشفر لمقاومة السلفونومايد .هناك على الاقل نوعين من جينات *dhps* بلازميدية الاصل تشفر لانزيمات مقاومة السلفونومايد في البكتريا السالبة لصبغة كرام كما في بكتريا *N. meningitidis*.

توجد في سلالات طفيلي الملاريا *Plasmodium falciparm* أشكال مختلفه لمقاومة السلفونومايد ناتجة عن تحوير أنزيم DHPS في المناطق الجغرافية التي يستعمل فيها علاج Sulfadoxime خلطا مع مثبطات DHFRs والتي تتضمن Pyrimethamine و Cycloquanil وتستعمل في الوقاية والعلاج من الملاريا .

4- مضخات الدفق Drug efflux pumps

هناك أنواع مختلفة من مضخات الدفق في بدائية وحقيقة النواة لها دور مهم في المقاومة الذاتية لمضادات الحيوية والمواد السامة الاخرى ، يمكن جمعها في أربع مجاميع او عوائل هي:

1- MFS (عائلة Major Facilitator)

2- RND (عائلةResistanse-nondulation-division) تعد أشهر هذه المجاميع وأكثرها انتشارا في البكتريا السالبة لصبغة كرام.

3- SMR (عائلة Small multidrug resistanse)

4- ABC (عائلة ATP-biniding cassette)

أكتشفت مؤخرا في بكتريا *E.coli* مضخات MATE عائلة multidrug-toxic compound extrusion ، وتوجد مضخات NorA في بكتريا *S.aureus* تعمل على طرد مضادات الكوينولون والكلورمفينيكول ومدى واسع من المركبات الاخرى .

اما نظام Qac A في بكتريا *S.aureus* فيعمل على طرد مركبات الكلورهكسدين. ونظام AcrAB يمنح مقاومة ذاتية للمضادات الكبيرة المحبة للدهون مثل الارثرومايسين وحامض Fusidic وكذلك بعض المنظفات.

توجد مضخة الدفق SMR في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وبكتريا السل ، بعد دراسة جينات خميرة الخبز *Saccharomyces* وجد ان هناك 30 جين مسؤولة عن مضخات ABC و28 جين مسؤولة عن مضخات MFS ، وتلعب هذه المضخات دورا مهما في مقاومة المضادات في خلايا حقيقة النواة . وجد أن هناك اثنين من مضخات الدفق نوع ABC في بكتريا *E.coli* هي mac AB-TolC و acrAB مهمتها مقاومة الماكروليدات.

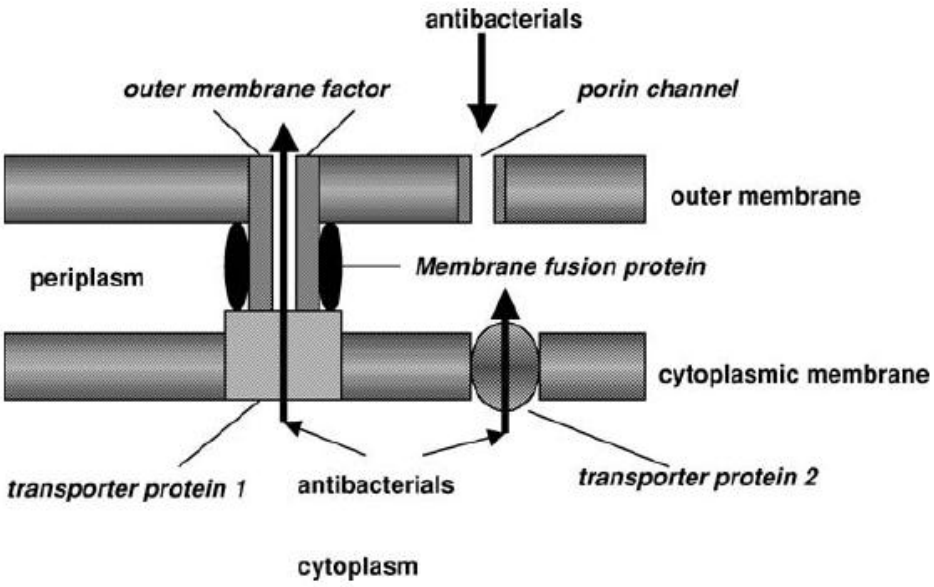
وتمتلك بكتريا *Enterococcus faecalis* أربع مضخات دفق مهمة لمقاومة مضادات lincosamide.

وجد أن هناك جينات بلازميدية الاصل تكون مسؤولة عن مضخات دفق التتراسايكلين بينما تكون هذه الجينات في بكتريا *E.coli* كروموسومية مرتبطة مع جين *marA* الذي يحفز المقاومة الذاتية لبعض المضادات ، توجد 25 جين تشفر لمضخات دفق التتراسايكلين في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، (18) من هذه الجينات هي *tet* وسبعة هي *otr* (مقاومة oxytetracycline) وهناك جينات جديدة تكتشف بصورة مستمرة تشفر لمضخات دفق التتراسايكلين أغلب هذه المضخات تشفر لمقاومة جميع التتراسايكلينات عدا Minocycline و Tigecycline . ومن الأمثلة على مضخات الدفق المسؤولة عن مقاومة مضادات الكوينولون : مضخة Cme ABC في بكتريا *Campylobacter jejuni* و AcrAB-TolC و Acr EF-TolC و Emr B في بكتريا *E.coli* ومضخات Mex AB – OprM و Mex CD – OprJ و Mex EF – OprN و Mex XY – OprM في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و مضخات PmrA في بكتريا *Salmonella typhimurium* و AcrB في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* ومضخات NorA في بكتريا *S.aureus* . كذلك توجد مضخات AmrAB-OprA في بكتريا *Burkholderia pseudomallia* والتي تلعب دورا مهما في زيادة مقاومة هذه البكتريا لمضادات ألأمينوكلايكوسايد.

تكون بعض المضخات متعددة Multipurpose أي تضخ اكثر من مضاد مثالها مضخة في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تضخ التتراسايكلين والسبروفلوكساسين و الكلورمفنكول والأرثرومايسين و البنسلين ، وتوجد مثل هذه المضخات في بكتريا اخرى مثل بكتريا *S.aureus* تضخ السبروفلوكساسين والمضادات ذات العلاقة.

أتجهت أنظار الباحثين لأستعمال مثبطات مضخات الدفق لتسهيل عمل وزيادة كفاءة مضادات الحيوية ، أذ أستعملت مثبطات بروتين الدفق NorA مثل reserpine وOmperazole وهي بذلك تآزر فعالية مضادات سبروفلوكساسين ونورفلوكساسين ضد بكتريا *S.aureus* المنتجة لبروتين NorA ، وركزت أبحاث كثيرة على تثبيط مضخات Mex في بكتريا

Pseudomonas aeruginosa . وهناك مثبطات من مصادر طبيعية من النباتات الطبية مثل Berberis نوع *Hydratis canadensis* ، أذ يعمل Berberine على زيادة نفاذية الغشاء ، وهي تحوي مثبطات مضخات دفق البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، ويمكن استخلاص مركب منها هو MHC (5-methoxyhydrocarpin).



شكل 49 : مضخات دفق المضادات في البكتريا السالبة لصبغة كرام.

5 – ميكانيكات أخرى للمقاومة

5-1: زيادة أنتاج المواد التنافسية

يدخل في المسار الايضي لصنع حامض الفوليك (Folic acid) مركب اولي يدعى Para-aminobenzoic acid (PABA) يتفاعل مع مركب Hydroxymethyl dihydropteridine بوجود أنزيم Dihydropteroic Synthetase (DHPS) ليعطي مركب Folic acid وهذا بدوره يتحول الى Tetrahydrofolic acid بوجود أنزيم Dihydrofolate Reductase (DHFR) من ثم يتحول الى Pyrimidines و purines التي تدخل في صنع DNA .

يعمل مضاد Sulphonamide على تثبيط عمل أنزيم DHPS في حين يثبط مضاد Trimethoprime أنزيم DHFR. يرتبط مضاد Trimethoprime بأنزيم البكتريا بألفة أعلى 60 ألف مرة من ألفة أرتباط أنزيم الأنسان .

تقاوم البكتريا هذه المضادات بزيادة أنتاج مادة PABA لكي تدخل مسار صنع حامض الفوليك وتنافس بذلك مضاد Sulphonamide وبالتالي يستمر صنع حامض الفوليك.

2-5: فقدان فعالية المضاد

مضاد Metronidazole :

يكون هذا المضاد مهم في علاج الاصابات المتسببة عن البكتريا اللاهوائية والطفيليات الابتدائية والبكتريا المسببة لقرحة المعدة *H. pylori* ، وتعتمد فعاليته على أختزال الايض في البكتريا الهدف أذ يتم فقدان الانزيمات الداخلة في تنشيط المضاد .يتم في بكتريا *H. pylori* الحساسة للمضاد تنشيط المضاد بانزيم Nitroreductase المشفر بجين *rdx* A فتحصل مقاومة المضاد من خلال طفرات في جين *rdx* A الذي يمنع تنشيط المضاد.

مضاد Isoniazid:

يكون هذا المضاد فعال ضد بكتريا السل وتعتمد فعاليته عى فعالية Catalase-peroxidase في البكتريا والمشفر بجين *kat*G . تؤدي الطفرات في جين *kat*G الى مقاومة المضاد من قبل العزلات المرضية . يكون هذا الأنزيم غير موجود في خلايا الأنسان وبذلك يتم تنشيط المضاد داخل الخلايا البكتيرية فقط ، وتتم مقاومته من قبل البكتريا بواسطة الطفرات في الجين *kat*G وبالتالي ينتج انزيم جديد لا يستطيع تحويل المضاد الى الشكل الفعال .

مضاد Pyrazinamide:

يعد من المضادات الفعالة ضد بكتريا السل يحتاج للتنشيط ليتحول من مركب غير فعال الى فعال (Pyrazinoic acid) بواسطة أنزيم Pyrazinamidase الموجود في خلايا بكتريا السل.تكون بعض العزلات المرضية لبكتريا السل فاقده لهذا الانزيم وبالتالي تكون مقاومة للمضاد .

أدى خلط المضادات سوية ضد بكتريا السل الى تقليل نسبة الأصابات بهذه البكتريا بشكل كبير من سنة 1950 الى 1980 في البلدان الصناعية ، لكن في البلدان الأخرى مثل بلدان قارة افريقيا بقى مرض السل سائد ، أذ تسجل ثلاث أصابات جديدة كل سنة بين كل ألف أنسان ، بينما تحصل ثلاث أصابات جديدة لكل 100 ألف شخص سنويا في الولايات المتحدة الأمريكية.

3-5: حماية الرايبوسوم ضد التتراسايكلين

تحدث المقاومة للتتراسايكلين بواسطة بروتينات حماية الرايبوسوم وهي تسع بروتينات مشفرة بجينات *tetM* و *tetO* و *tetQ* واسعة الانتشار بين البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، لكنها لا توجد في بعض أنواع البكتريا المعوية وقد تكون محموله على بلازميد او قافز (ترانزبوزون) . يساهم بروتين حماية الرايبوسوم نوع (M) Tet في أرتباط aminoacyl tRNA بموقع الرايبوسوم A بوجود تراكيز من مضاد التتراسايكلين التي تثبط بهذه العملية، تحدث تغيرات بين جزيئة التتراسايكلين وارتباطه بالوحده 30S للموقع A. يكون تركيب بروتينات TetM و TetO مشابه لعوامل الأستطاله Ef-Tu و Ef-G التي ترتبط بالرايبوسوم ولها فعالية GTPase . تكون مضادات التتراسايكلينات الحديثة مثل tiegcycline فعاله ضد السلالات المحتويه *tetM* .

4-5: مقاومة البكتريا للفانكومايسين

يوصف هذا المضاد بانه المضاد الفعال المهم ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمشلين وبكتريا *Enterococcus* المقاومة للبيتالاكتام. تعتمد فعاليته ضد البكتريا بارتباطه الى D-alanyl-D-alanine في الببتيدوكلايكان في جدار الخلية . تعتمد مقاومه البكتريا لهذا المضاد على أستراتيجية مهمة لأستبدال D-alanine طرفي في الببتيدوكلايكان بحامض α−hydroxy D-lactate و ، أي استبدال D-alanyl-D-alanine ب D-alanyl-D-lactate بواسطة أنزيمات VanH و VanA ، تكون الفة الفانكومايسين لـ D-alanyl−D-lactate اقل بالف مرة من D-alanyl-D-alanine في البكتريا الحساسة . يكون الجين *van*A المشفر لمقاومة الفانكومايسين في *Enterococcus faecalis* محمول على Tn 1546.

أوضحت الدراسات ان عزلات بكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين تحوي Tn 1546 وان مصدره من بكتريا *Enterococcus faecalis* .

تحتاج الخلية لمقاومة هذا المضاد خمس جينات تشفر لخمس أنزيمات هي:

أنزيم **VanH** يعمل كأنزيم dehydrogenase يحول حامض البايروفك الى حامض لاكتيك.

أنزيم VanA يعمل كأنزيم Ligase يساعد في تكوين اصرة استر بين D-alanyl و D-lactate.

أنـزيم Vanx هـو peptidase يحلـل D-alanyl –D-alanine . **أنـزيم Vany** يزيـل D-alanine الطرفـي للببتيـدوكلايكان .**أنـزيم Van Z** يشـفر لمقاومـة Teicoplanin بميكانيكية غير معروفة .

وجد أن جينات *van*A و *van*B محمولة على بلازميد وتنتقل من بكتريا *Enterococcus faecalis* الـــى بكتريـــا *S.aureus* المقاومـــة للمشـــلين (MRSA)، تـــرتبط مقاومة السلالات المرضية لبكتريا *S.aureus* لمضاد الفانكومايسين مع سمك الببتيدوكلايكان ، والمعـروف ان سـمك الببتيـدوكلايكان يـزداد بـاختزال فعاليـة أنزيمـات autolysin التـي تزيـل الطبقات الخارجية القديمة للببتيدوكلايكان اثناء نمو الخلايا البكتيرية .

يـزداد تثبـيط بنـاء الجـدار الخلـوي بزيـادة فعاليـة autolysis مـن خـلال التـأثير علـى الببتيدوكلايكان ، لا زال الاساس الوراثي لمقاومة الفانكومايسين قيد الدراسة والبحث.

6) تنظيم مقاومة مضادات الحيوية

أن الطفرات التي تقود الى مقاومة مضادات الحيوية تكلف الخلية طاقة فتكون بذلك الخلية أقل كفاءة من الناحية الأيضية ، وأن أحد الأمثلة على ذلك مقاومة الخلية البكتيرية للتتراسايكلين أذ تكون المقاومة لـه محفزة أذ تعمل مضخة دفق التتراسايكلين فقط عند وجود هذا المضاد ، وان عمل المضخة يكلف الخلية طاقة .

عند غياب التتراسايكلين يرتبط بروتين الكابح (repressor) بجزيئة DNA قرب جين مقاومة التتراسايكلين وبالتالي يمنع أستنساخ هذا الجين فلا تعمل مضخة الدفق . وعند وجود المضاد فأن جزيئاته ترتبط بالبروتين الكابح مما يغير شكل الكابح فلا يرتبط بجزيئة DNA وبالتالي يتنشط جين مقاومة التتراسايكلين ثم ينتج بروتين مقاومة هذا المضاد وعندما يقل مستوى المضاد فأن الكابح يرتبط مرة ثانية بجزيئة DNA فيتم أيقاف عمل الجين .

تـم وصـف موقـع أوبـرون *marRAB* فـي بكتريـا *E.coli* المقاومـة للتتراسـايكلين مـن قبـل George و Levy سنة 1983 ، يعد الجين *marR* أول جينات الأوبرون ويلعب الدور الحرج في عمل الأوبرون أذ يشفر لبروتين الكابح لعمل الأوبرون .

المثال الأخر هو مقاومة مضاد الأرثرومايسين أذ تمتلك البكتريا المقاومة لهذا المضاد جين مسؤول عن أضافة مجموعة مثيل (CH_3) الى rRNA ، هذا التحوير يحمي الخلية من فعل المضاد لكنه يقلل كفاءتها في بناء البروتين ، تحصل المقاومة عند وجود الأرثرومايسين فقط وكالأتي :

عند أستنساخ الجين الى mRNA فأن جزء من RNA يتكون فيه تركيب دبوس الشعر (Stem – Loop) ويترجم mRNA الى بروتين فتصبح الخلية مقاومة لمضاد الأرثرومايسين . عند دخول المضاد الى الخلية تكون بعض الرايبوسومات غير قادرة على العمل بكفاءة عندها يتكون تركيب دبوس الشعر مما يؤدي الى تكون mRNA فعال وتحصل الترجمة بواسطة رايبوسوم غير متأثر .

درست ميكانيكية تنظيم مقاومة بكتريا *S. aureus* للبنسلين والمضادات الأخرى ذات العلاقة به ، وجد أن السلالات المقاومة تحوي أنزيمات محطمة للبنسلين وهي أنزيمات البيتالاكتاميز التي يتوقف أنتاجها بغياب البنسلين والمضادات القريبة منه ، عند وجود البنسلين فأن جزيئاته ترتبط ببروتين متحسس على سطح الخلية البكتيرية، يكون هذا البروتين قادر على تمييز كميات صغيرة من البنسلين في البيئة ، عند أرتباط البنسلين فأنه يتسبب في قيام البروتين بقطع نفسه (الجزء داخل خلوي) ، ثم يصبح هذا الجزء من البروتين حرا لينتقل حول الخلية وعند وصوله الى بروتين الكابح فسوف يقطعه بالنصف ، يرتبط الكابح بصورة أعتيادية بجزيئة DNA قرب جين البيتالاكتاميز فيمنع عملية الأستنساخ.

عند أرتباط البروتين المقطوع بالكابح فأن الأخير يتحطم مما يسمح لجين البيتالاكتاميز بأن يستنسخ فينتج أنزيم البيتالاكتاميز.

من المنظمات الاخرى لمقاومة المضادات هو *ramA* موجود في بكتريا *Klebsiella pneumonia* . يشفر الجين *ramA* لبروتين Ram A منشط للاستنساخ ويكون ذو علاقة ببروتين Mar A في بكتريا *E.coli* . يشفر الجين *ramA* لمقاومة مدى واسع من المضادات التي ليس لها علاقة بالتركيب .تكون جينات *marA* و *ramA* واسعة الانتشار في البكتريا السالبة لصبغة كرام وتعمل على تنظيم مقاومة مضادات الحيوية .

يتضح من الأمثلة أعلاه ان الخلية البكتيرية يمكن ان تبقى حساسة للمضاد حتى لو كانت تحمل جينات المقاومة ضمن الجينوم ، كما في بعض أشكال المقاومة المحفزة لمضاد الفانكومايسين فلا تتنشط هذه المقاومة عندما تتعرض البكتريا للمضاد القريب منه مثل مضاد Teicoplanin.

الفصل السادس
الأساس الوراثي لمقاومة مضادات الحيوية

1- التطفير ودوره في مقاومة مضادات الحيوية

أن أحد الأسباب المهمة لمقاومة مضادات الحيوية هو الطفرات التلقائية والتي تنشأ عن ضرر في الجينوم بسبب عوامل بيئية مختلفة من ضمنها الأشعة المتأينة والمطفرات الكيمياوية أو لإزدواج قاعدي خاطئ خلال تضاعف الجينوم أو بحذف قطعة من DNA أو غرز مواد وراثية متحركة مثل القافزات (الترانزبوزونات).

بالرغم من كون الطفرات التلقائية نادرة الأ أنها تكون مؤثرة وتحدث بنسبة 1 لكل مليون خلية ، لو فرضنا وجود مليار خلية بكتيرية في شخص ما فيمكن ان تكون هناك 100 خلية يحصل بها طفرة ينتج عنها خلايا مقاومة لمضاد معين .

تظهر 33% من سلالات بكتريا *Helicobacter pylori* المرتبطة مع قرحة المعدة وسرطان المعدة نسبة عالية من الطفرات المقاومة لمضادات الحيوية، وتكون طبيعة الطفرات العالية غير معروفة حالياً لكن قد يكون ذلك ردا على الاستعمال الواسع لمضادات الحيوية لأزالة بكتريا *Helicobacter pylori* من المعدة ، أي أن الطفرات تسبب زيادة عالية في مقاومة المضادات .

تتعرض جميع الخلايا الحيه الى عوامل فيزيائيه وكيميائيه لها القابليه على تغيير التركيب الاولي لجزيئة DNA . هذه التغييرات التي تحصل في المادة الوراثية قد تكون مميته للخلايا او تؤدي الى تغييرات ليست في صالح الخليه، من جهة أخرى فهي تمثل رافداً مهماً في عمليات تطوير الأنواع. تعرف التغيرات في النمط الجيني القابلة للتوارث بالطفرات (Mutation) ويسمى الفرد الذي تظهر عليه التغيرات بالفرد الطافر (Mutant) ، وهذه التغيرات في المادة الوراثية اذا لم تصحح سوف تقود الى حصول طفرات بينما لا تؤدي بعض هذه التغيرات الى تغيير في تسلسل الأحماض الامينيه للببتيد او تسبب تغيير في تسلسلَ الأحماض الأمينية لكن لا تغير في الموقع الفعّال (active site). ان تراكم الطفرات يكون مهم للحصول على تباين وراثي جديد يساعد الكائن الحي على مواجهة التطور أي ممكن ان تكون مصدر قوة للفرد للتكيف مع البيئات الجديده.

تصنف الطفرات حسب طبيعة حدوثها الى :

- الطفرات التلقائية (Spontaneous mutation): التي تحدث بشكل طبيعي نتيجة حدوث خطأ أثناء تضاعف DNA . وتكون نادرة الحدوث ويصل تكرارها $10^{-7} - 10^{-10}$ ، ويعد حدوث هذه الطفرات احد الوسائل المهمة في تطور الأحياء.

تحوي بعض البكتريا على جينات عالية التغير تدعى Mutator genes تؤدي الى حدوث الطفرات التلقائية بشكل كبير في عدد من الجينات وتسمى الأحياء الحاوية على هذه الجينات بأحياء فائقة التطفر (Mutator Microorganisms).

عند تعرض هذه الأحياء لظروف غير ملائمة او لأجهادات (Stresses) بيئيه يحصل لها انتخاب أي تكثر الطفرات المتطبعة. ومثال على هذه الاحياء هي البكتريا المرضية مثل *Pseudomonas aeruginosa* و *S. aureus* .

- الطفرات المستحدثه (Induced mutation) : تحدث نتيجة تعريض الكائن الحي الى عوامل مطفره (فيزيائيه او كيميائيه).

من المطفرات (Mutagens) المهمة :

أ- المطفرات الكيميائيه:

1) **5- Bromo uracil** (5-Bu) : يشبه في تركيبه الكيميائي القاعده النايتروجينية الثايمين وله القابلية على الازدواج مع الادنين عندما يحل محل الثايمين في DNA وبالتالي يتغير الشكل A – T الى G – C مما يقود الى التغير في الشفره الوراثيه وبالتالي ظهور الصفه الجديده.

2) **حامض النتروز** : يعمل على أزالة مجموعة الامين لعدد من القواعد النايتروجينية في DNA وبالتالي تتغير الى مركبات اخرى لها القابلية على الازدواج مع قواعد اخرى مما ينتج عن ذلك تغير في تسلسل القواعد وبالتالي تغير في الشفره الوراثية وظهور صفات جديدة.

- تتغير قاعدة الادنين الى هايبوكزانثين التي تتحد مع السايتوسين بدل الثايمين.
- تتغير قاعدة الكوانين الى كزانثين التي تتحد مع السايتوسين بآصرتين هيدروجينيه.
- تتغير قاعدة السايتوسين الى يوراسيل التي تتحد مع الادنين بدل الكوانين.

- يعمل المطفر هيدروكسيل أمين على تغير التركيب الكيميائي للقواعد الناتروجينية (فهو ضمن المطفرات التي تعمل على تغير تركيب القواعد).

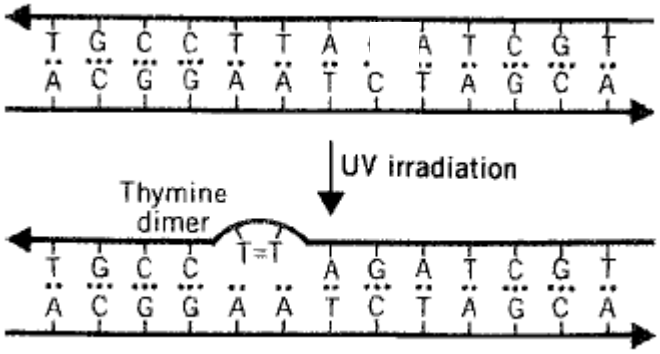
3) **Ethyl Methane Sulphonate (EMS)** و **Ethyl Ethane Sulphate (EES)**:
يعمل على أزالة القواعد البيورينية خاصة الكوانين وبالتالي يصبح مكانها فارغاً وعند تضاعف DNA يمكن لاي قاعدة من القواعد النايتروجينة الاربعة ان تحل محلها وبالتالي يكون هناك تغير في الشفرة الوراثية.

4) **صبغة الاكردين:** لها القابلية على الدخول بين القواعد النايتروجينه في DNA ويمكن ان تعمل على ازالة القواعد النايتروجينية وبالتالي تظهر صفات جديدة بسبب تغير الشفره الوراثية.

5) **Mitomycin - C** : يسبب ارتباط تآصري بين القواعد النايتروجينية وبالتالي يعيق عملية تضاعف DNA.

ب – **المطفرات الفيزيائيه**

1) الاشعة فوق البنفسجية: تؤثر هذه الاشعة أما بشكل مباشر أو غير مباشر، يكون الضرر الرئيسي لهذه الاشعة هو أحداث أزدواج (Dimers) بين البرميدينات المتجاوره في جزئية DNA ، خاصة أزدواج الثايمين (Thymine Dimers) وبالتالي حدوث تشوية لسلسلة DNA وحدوث خلل في التضاعف، اما التأثير غير المباشر فينتج عن تحلل جزيئات الماء المحيطة وانتاجها للجذور والتي تؤثر على المادة الوراثية.



شكل 50: حدوث أزدواج الثايمين بتأثير الأشعة فوق البنفسجية.

2) الاشعاعات المؤينه (Ionizing radiation):

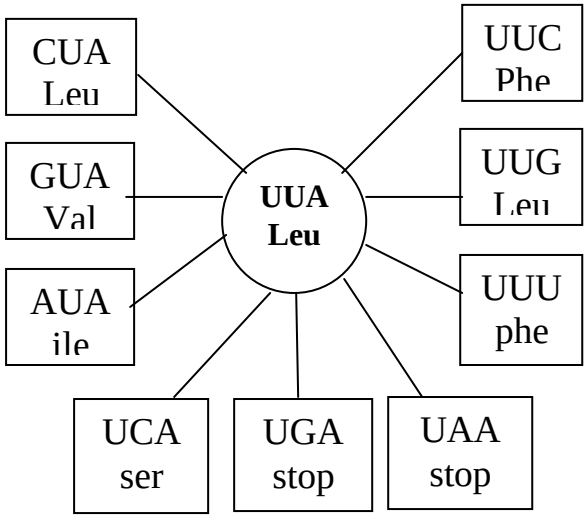
مثالها أشعة X وأشعة بيتا واشعة كاما، تؤدي الى تأثيرات مباشرة مثل كسر بالكروموسوم او تأثيرات غير مباشرة مثل تحويل بعض مكونات السايتوبلازم الى مكونات فعالة محدثه للتطفير.

تكون بعض الطفرات مفيده بالنسبة للخليه البكتيرية ، اضافه الى ان بعضها يكون مفيداً للانسان كما في تطوير السلالات المنتجه لبعض المواد وبعض الطفرات تكون مميته للخلايا خاصه اذا حصلت في مواقع حساسه او ضرورية للخلية .

يمكن تقسيم الطفرات الى عدة أصناف على ضوء التغيرات الجزيئية التي تحصل:

1- الطفرات النقطية (الموقعية) point mutation :

طفرات ناتجة عن تغير في تتابع DNA في موقع واحد ، هذا التغير يتضمن أستبدال نيوكليوتيده باخرى، وهو يعتمد على طبيعة التغير او موقعه ، اذا كان التغير في المنطقة المشفره للجين (المنطقة التي سوف تترجم الى بروتين) سوف تسبب تغير في تتابع الاحماض الامينية وبالتالي يمكن ان يؤثر على وظيفة البروتين ، ويمكن ان يكون التغيير قليل او معدوم لان الشفره الوراثية تتكون من ثلاث قواعد نتروجينية وان التغير يحصل في قاعده واحده (اذا استبدلت قاعدة بيورينية بقاعده بيورينيه اخرى او قاعده برميدينيه باخرى برميدينيه تعرف بطفره التحول (Transition mutation) ، اما اذا استبدلت قاعده بيورينية مكان قاعده برميدينيه او بالعكس تدعى طفره مستعرضة (Transversion mutation). كمثال : عند تغير قاعده واحده في الشفره UUA التي تشفر للحامض الاميني Leucine ينتج واحد من تسع شفرات كما موضحه في الشكل الأتي:



تنشأ هذه الشفرات التسع بتغير موقع قاعدة منفرد من شفره UUA

شكل 51 : الطفرات الناتجة عن تغير قاعدة واحدة في تتابع DNA .

تكون الشفرتين UUG و CUA شفرات صامته (Silent) وتنتج عن تغير الشفره الوراثية الى شفره تشفر للحامض الاميني نفسه (مثلا Leu) وبالتالي لايظهر تغير على ناتج الجين وبالتالي تكون هذه الطفرات متشابهة من الناحية المظهرية للخلايا الاصلية ولكن عند تحديد توالي القواعد النايتروجينية يظهر الاختلاف.

وهذه الشفرات تعرف بـ Synonymous codons

تشـفر الشـفرتين AUA و GUA لأحمـاض Isoleucine و Valine علـى التـوالي وهـذه الأحمـاض الأمينيـة تشـبه حـامض Leucine (أحمـاض أمينيـة كارهـة للمـاء) وبالتـالي يكـون التأثير قليل على البروتين.

تشفر الشفرتين (UUC) و (UUU) للفنيل النين ، وهو حامض كاره للماء ايضاً لكن يسبب تغيير واضح في تركيب البروتين في هذه النقطة.

الاخـتلاف الواضـح يكـون فـي شـفره UCA المشـفره للـحامض Serine والـذي يختلـف عـن حامض Leucine.

تكون شفرات UAA و UGA عبارة عن شفرات أنهاء(Stop codons) لعملية صنع البروتين وهـي أيضـاً شفرة ختم وتدعى Nonsense mutation وتؤدي الـى فقدان الفعاليـة الحيوية للبروتين بالكامل ويعتمد ذلك على درجة التغيير او البتر في البروتين.

هناك أنواع مختلفة من الطفرات تتضمن تغيير في موقع واحد، مثل طفرات الحذف (Deletion) وهـي ناتجـه عـن أزالـة نيوكليوتيـده (او اكثـر) وطفرات مقتحمـه أو غـرز (Insertion) ناتجة عن اقتحام او اضـافة نيوكليوتيـده واحده (او اكثـر) وهذه الطفرتين تعرف بـ Frameshift mutation

التتابع الأصلي

AUG CUA GCU AGC UUA CCU AUU CGA UUC UAC CUG AGC

↓

Meth. Leu Ala Ser Leu Pro ile Arg Phe Tyr Leu Ser

التتابع بعد حذف قاعده مفر دة

AUG CUA CUA GCU UAC CUA UUC GAU UCU ACC UGA
Meth Leu ↑Leu Ala Tyr Leu Phe Asp Ser Thr شفرة انهاء
مكان الحذف

تغيير في تتابع الأحماض الأمينية

↓

AUG CUA CUA GUA UUA CCU AUU CGA UUC ...
Meth Leu Leu Val Leu Pro ile Arg phe

↑غرز قاعده وبالتالي يعطل الطفره

شكل 52 : الطفرات الناتجة عن تغير قاعدة نايتروجينية واحدة.

2- الطفرات المشروطة Conditional Mutants

تكون الجينات ذات وظيفة أعتيادية تحت ظروف او شروط معينة بينما تقل فعاليتها (او تنعدم) عند تغير هذه الظروف فتكون بذلك الطفرات مشروطة بظروف معينة. وكمثال على ذلك ان بعض البكتريا تنمو في درجة حرارة معينة ولا تنمو بغيرها ، فتنتج هذه الطفرات انزيم فعال تحت درجة حرارة معينة ولكن هذا الانزيم يكون غير فعال او فعال جزئياً في درجة حرارة اخرى.

3- تغيرات ذات نطاق اوسع في DNA (Large Scale DNA Alteration) :

المعروف ان في الطفرات النقطية (Point Mutation) يحصل تغير في قاعدة واحده، لكن هناك تغيرات في البكتريا (والاحياء المجهرية الاخرى) تحصل في جزء اكبر من الجين (او حتى اكثر من جين) أذ تتعطل وظيفة هذا الجين.

هذا النوع من التغيرات يمكن ان يكون مهم بالنسبة للتنوع الطبيعي للاحياء المجهرية.

عندما تنغرز قطع خارجية من DNA في الجين فانها سوف تعطل هذا الجين، وكذلك بالنسبة للعناصر القافزه او المتنقله Insertion Sequences (IS) فانها تمتلك القابلية للانغراز بين تتابعات DNA وهذا يسبب طفرات أضافية (Insertion Mutation) . المعروف ان الطفرات التلقائية يمكن ان تحدث عن طريق تعطيل جينات بغرز نسخ من IS وليس فقط عن طريق اخطاء في التضاعف.

تكون الجينات القافزه (Transposons) شبيهه بتتابعات IS فانها تنتقل من مكان الى آخر ضمن الجينوم وهي تختلف عن IS بكونها تحمل اكثر من جين خاصة جينات مقاومة مضادات الحيوية وهي تلعب دوراً مهماً في التطور وانتشار مقاومة المضادات.

أضافة الى ما ذكر اعلاه عن التغيرات هذه فهنالك نوع اخر هو حدوث مناطق من DNA بشكل معكوس وهي Invertible Sequences ومثال بسيط عليها هو تغير او تغاير في مستضدات السوط في بكتريا *Salmonella typhimurium*.

عندما يتعرض الكائن الحي الى طفره تفقده احدى صفات السلاله الام تدعى الطفره بـ الامامية (الاولية)(Forward mutation) . وعند استعادة هذا الكائن لتلك الصفة بواسطة طفرة حظ فانها تدعى الطفرة الراجعة (Back mutation) .

السلالة الطافره بشفرة UUU (تشفر لحامض Phenylalanine كما تم توضيحه بالمخطط أعلاه) يمكن ان تخضع لطفرة اخرى بشفرة UUA (هذه هي طفرة راجعة) والسلالة هنا رجعت الى شكلها الطبيعي (Reverted mutants) وتدعى ايضا بالخلايا الراجعات (Revertants)

قد يكون الرجوع حقيقي بحيث تستعيد الخلايا المطفره تتابع نيوكليوتيداتها الاصلي او رجوع كاذب (Pseudoreversion) وفي هذه الحالة يكون هناك تغير في الفعالية والحساسية للحرارة والمثبطات الكيميائيه.

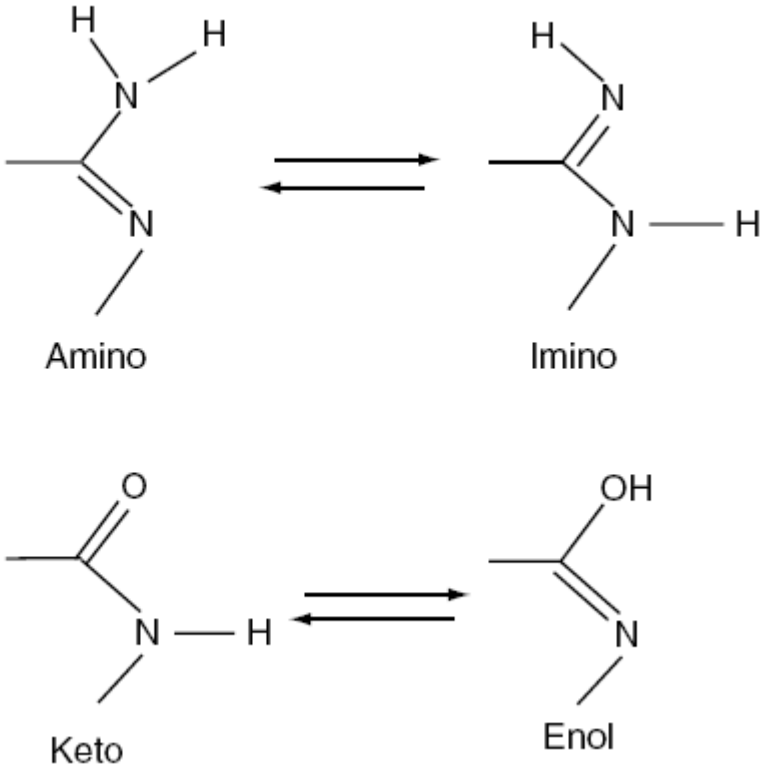
يمكن ان يحصل تغير في تتابع القواعد في الطفره الثانية وتعود السلالة الى نمطها الطبيعي ولكنها تكون مشابهه لها على المستوى المظهري فقط دون النمط الوراثي (genotype) أي يعود تسلسل القواعد في مكان مختلف عن موقع الطفره الامامية فتدعى الطفرات الكاتمة او المخمدة (Suppressor mutation) وهذا الكتم او الاخماد اما يكون داخل الجين نفسه (Intragenic) او خارج الجين المطفر (Extragenic).

هناك طريقة من خلالها تتمكن السلاله الطافره من استعادة صفه السلاله الام وهي وجود بلازميد يحمل نسخة من الجين (المتضرر بالطفره) على سبيل المثال سلالهَ Lac^- لبكتريا *E.coli* يمكن ان تعود لها القابلية على استهلاك اللاكتوز بوجود بلازميد يحمل جينات اضافية لاستهلاك اللاكتوز وهنا يشار لهذا البلازميد بانه مكمل للنقص الحاصل بالكروموسوم بعملية تكامل (Complementation).

ميكانيكية حصول الطفرات التلقائية:

المعروف ان الحلزون المزدوج يتكون من أزدواج قواعد A:T و G:C وان أي ازدواج اخر يتسبب في تشوية هذا الحلزون. وتحصل الطفرات التلقائية بالاساس اثناء الاخطاء في عملية تضاعف DNA ، يرتبط T : A بالحالة الطبيعية لما يكون الادنيين بشكل amino والثايمين بشكل keto لكن عندما يصبح الادنين بشكل Imino فانه يزدوج مع السايتوسين ولما يكون Thymine بشكل enol فانه يزدوج مع الكوانين.

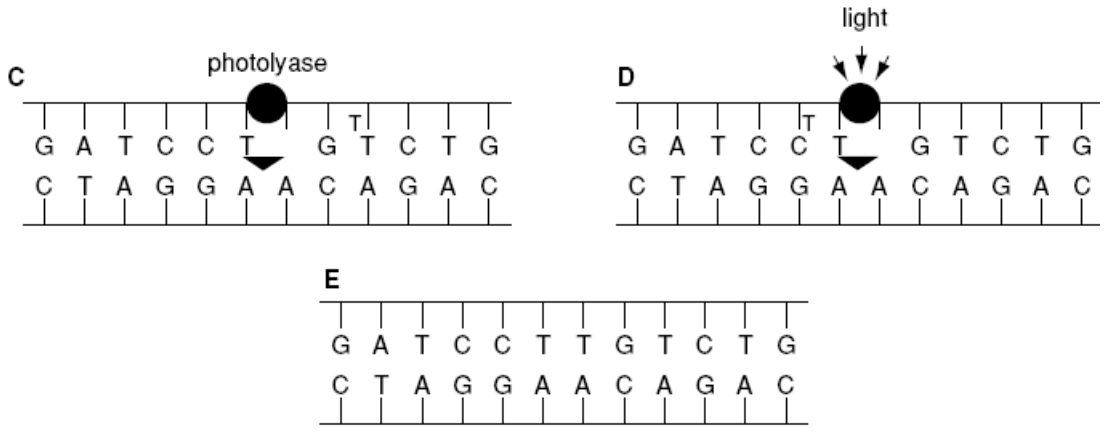
اذن يحصل التشويه عندما يتحول الشكل amino الى Imino ويتحول الشكل Keto الى enol (الاشكال المشدوده Tautomeric forms) ويمكن أرجاعها الى شكلها الطبيعي ويتم اصلاحها بعملية التصحيح (Proofreading) لانها بالاساس لاترتبط بشكل صحيح وقوي مع القاعده المقابلة في الشريط المقابل لكن عند فشل عملية التصحيح تحصل الطفرة التلقائية، والحقيقة ان عملية proofreading لا تعد هي عملية التصحيح الوحيدة ، فان هناك بضع ميكانيكيات لاصلاح الخطأ في DNA وتكون ميكانيكيات الاصلاح مهمة كدفاعات للخلية ضد مختلف العوامل التي تسبب تحطيم او تشوية DNA، وهذه الميكانيكيات هي التي تبقي على المستوى الواطئ لحصول الطفرات.



شكل 53 : الاشكال المشدوده (Tautomeric forms)

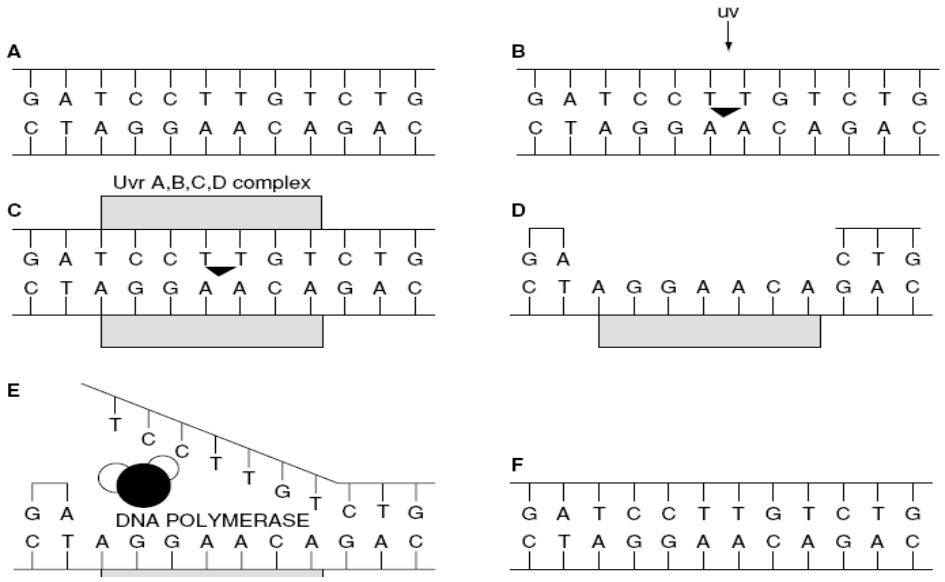
ميكانيكية أصلاح DNA

1- **التنشيط الضوئي (photoreactivation)**: تعد وسيلة مهمة لحماية DNA من الأشعة فوق البنفسجية ، تتم هذه الميكانيكية بواسطة انزيم يعمل بوجود الضوء المرئي هو photoreactivation enzyme وهو أنزيم photolyase يعمل على شطر دايمرات الثايميين مباشرة بكسر الاصره المتكونه بينهما ولا يزيل أي من النيوكليوتيدات.



شكل 54 : ميكانيكية الأصلاح بالتنشيط الضوئي بوجود أنزيم photolyase.

2) **الاصلاح عن طريق القص (excision repair)**:- يحدث بخطوات متسلسلة تشترك فيها أنزيمات يزال من خلالها دايمر الثايمين من جزيئة DNA ويتم قص قطعة DNA المحتوية على الدايمر بوجود بروتينات U.V.r وهي أنزيمات endonucleases بعدها تملأ القطعة المزالة بواسطة DNA polymerase 1 ثم يقوم أنزيم DNA ligase باعادة تكوين الاصرة Phosphodiester bond بين النيوكليوتيدين المتجاورتين . يكون المسؤول عن endonuclease ثلاث جينات (*uvr* C, *uvr* B, *uvr* A).



شكل 55 : الاصلاح عن طريق القص بوجود بروتينات U.V.r.

2) **الاصلاح عن طريق الاتحادات الجديدة** بعد عملية التضاعف Post - replication recombination repair : عند فشل عملية القص تبدء عملية الاصلاح عن طريق عملية recombination (عمليات قطع وربط قطع DNA) بحيث يحصل قطع للمنطقة المتضررة ويملأ الفراغ المتكون من قطعة DNA من الشريط المقابل ومكان هذه القطعة يملأ بانزيم DNA polymerase 1.

3) **نظام الاصلاح بالأستغاثة SOS repair**: عند عدم وجود ضوء مرئي فان الاصلاح بالتنشيط الضوئي يكون معدوم ويمكن ان تفشل عملية الاصلاح بالقص واصلاح recombination هنا عند تراكم الاخطاء في DNA غير المصحح في الخلايا تحصل استجابة الاستغاثه ويوجد منتجات من جينات نظام SOS هي نواتج جين

recA وجـين *lexA* . يعمـل بـروتين جـين *lexA* علـى كـبح جينـات الـنظام (*recA* و *lexA* نفسه) .

يمتلك بروتين جين *recA* وظيفة محللة للبروتين ويحفز تحلل بروتين lex A.

تنشأ فعالية Rec A بعد الارتباط بشريط DNA المفرد والذي نشأ عن تضرر DNA وعملية الاصلاح تكون مولدة للاخطاء وقد تؤدي الى الحصول على بروتينات غير فعالة نتيجة وجود أحماض أمينية بشكل خاطىء .

2- أصل جينات المقاومة المهمة سريرياً

تعد الطفرات أساسية في تنظيم مضخات دفق المضادات وتقليل أو فقدان وظيفة البورين في بعض البكتريا إضافة الى زيادة تعبير أنزيمات البيتالاكتاميز التنظيمية (Constitutive) في البكتريا المرضية مثل *Citrobacter freundi* و *Enterobacter cloaca* والطفرات التلقائية تقود كذلك الى تحويرات في أنزيمات البيتالاكتاميز.

يعتقد أن سلالات بكتريا السل المقاومة لمركبات Rifampicin و Isoniazed و Streptomycin و Ethambutol و Pyrizinamide حققت هذه المقاومة بواسطة الطفرات في الجينات المشفرة لمواقع الهدف لتلك المضادات والمركبات.

تنشأ مقاومة البكتريا للكوينولونات من خلال طفرات في الجينات المشفرة لأنزيم DNA gyrase وهو هدف عمل المضاد. تقوم البكتريا المنتجة للمضادات مثل *Streptomyces* بحماية نفسها ضد التأثيرات السامة لهذه المضادات بواسطة أنزيمات تثبيط الأمينوكلايكوساید والكلورمفنكول والبيتالاكتام، إضافة لذلك فأن بعض هذه البكتريا تعبر عن أنزيمات البيتالاكتاميز حتى في حالة عدم إنتاجها لمضادات البيتالاكتام كحماية ضد البيتالاكتام التي تنتج من كائنات أخرى في بيئتها الدقيقة.

تمتلك الجينات المشفرة لمضخات دفق التتراسايكلين بروتينات تحمي الرايبوسوم ضد التتراسايكلين والتحويرات الأنزيمية لحامض rRNA المرتبطه مع مقاومة الارثرومايسين.

قادت المعلومات عن تتابع الأحماض النووية وتتابع البروتين الى ألاقتراح بأن الجينات المشفرة للأنزيمات المثبطة للأمينوكلايكوساید والموجودة في العزلات المرضية المقاومة لهذه المضادات يمكن أن تكتسب أصلاً من *Streptomyces* الموجودة في التربة.

يمكن أن ينتقل جين مقاومة التتراسايكلين *tet M* من بكتريا *Campylobacter* او *Veillonella* او *Neisseria* الى بكتريا *Enterococcus* او *Lactobacillus* او

Staphylococcus ، وقد وجد ان هذا الجين نفسه موجود في البكتريا المعويه وبكتريا التربة و القناة المعوية للحيوانات .

3- Mosaic genes

بالرغم من أن جينات البكتريا التي تشفر للأنزيمات المثبطة للمضادات ومضخات دفق المضاد عرفت في الوقت القريب، الا أن المقاومة للمضادات التي تتواسط بالطفرات نالت أهمية خلال الحقبة الحديثة للعلاج الكيمياوي. إضافة لذلك فأن ظاهرة جينات Mosaic التي تنشأ بواسطة التأشب (recombination) الوراثي بين الأنواع تلعب دوراً مهماً في مقاومة مضادات الحيوية، كمثال على ذلك : المعروف أن مقاومة مضادات البيتالاكتام عن طريق تغيير في PBPs تنشأ عن تراكم الطفرات الوراثية في الجينات المشفرة لهذه البروتينات (PBPs)، كذلك تعد عملية recombination بين الجينات المشفرة لبروتينات PBPs من أنواع بكتيرية مختلفة سببا رئيسيا في الطراز المظهري لـ PBPs ذات الألفة القليلة لمضادات البيتالاكتام.

عند تحليل تتابع قواعد الجينات المشفرة لبروتين PBP2 في بكتريا السيلان *N. gonorrhoeae* وبكتريا *N. meningitidis* المقاومة للبنسلين والحساسة له، وجد أن التتابع في البكتريا الحساسة للبنسلين متساو مع تتابع جين المقاومة الذي يمتلك تركيب Mosaic.

تتسبب جينات Mosaic المشفرة لبروتين PBP_2 في تقليل الألفة للبنسلين، وقد بينت الدراسات أن أصل المناطق المتغايرة (المسؤولة عن المقاومة) في جين Mosaic هو من بكتريا *N.cinerea* و *Neisseria flavescens* . تم تحضير بروتينات PBP_2 من عينات بكتريا *N. flavescens* المحفوظة من حقبة قبل المضادات الحيوية وقد وجد أنها تملك ألفة قليلة للبنسلين مقارنة مع بروتينات PBP2 الموجودة في بكتريا *N. meningitidis* و *N.gonorrhoae* . تنشأ جينات الموزائيك من عملية recombination بين الأنواع يتبعه عملية Transformation بواسطة DNA المتحرر من الخلايا المتحللة.

عزلت جينات موزائيك من بكتريا *Streptococcus pneumoniae* المقاومة للبنسلينات والسيفالوسبورينات تشفر لبروتينات PBPs ذات ألفة قليلة للبنسلين مثل بروتينات Ia و 2a و 2b و 2x .

لا تكون جميع بروتينات PBPs ذات الألفة القليلة للبنسلينات ناتجة عن تكوّن جينات موزائيك، على سبيل المثال بروتين PBP_{2a} المشفر من قبل جين *mecA* يقع على قطعة DNA بطول 50 kb تنغرز في كروموسوم البكتريا، وقد أكتسبت بكتريا *S.aureus* هذا الجين عن طريق أنتقال الجين من بكتريا الى أخرى.

تنتشر ظاهرة جينات الموزائيك بشكل واسع في البكتريا كمثال على ذلك جينات التغير العالي المشفرة لبروتينات Outer membrane في بكتريا *Neisseria spp.*

يحدد التغاير في جين *tetM* شكل حماية الرايبوسوم لمقاومة التتراسايكلين والذي يحصل بعملية recombination في جين *tetM* والموجود في بكتريا *S.aureus* و *Streptococcus pneumoniae.*

4- حركة الجينات وأنتقال مقاومة مضادات الحيوية

يُعد الانتقال الأفقي للجينات (Horizontal genes transfer) بين الانواع والأجناس البكتيرية المختلفة مسؤولاً عن الانتشار السريع لمقاومة مضادات الحيوية وتطور سلالات ضارية من البكتريا المرضية، وطبقاً لتقارير منظمة الصحة العالمية سنة 1997 فإن هناك مشكلة عالمية تتمثل بازدياد الاصابات بالمسببات المرضية وبشكل أوبئة، إضافة إلى كون هذه المسببات المرضية تحمل مقاومة للعديد من المضادات ، حتى ان بعض السلالات تكون مقاومة لجميع المضادات المعروفة ، ومن الأمثلة على ذلك ازدياد الاصابات بالسالمونيلا بمعدل 20 ضعفاً في بعض الاقطار الاوربية خلال العقدين الماضيين ، وزيادة عدد الاصابات ببكتيريا *E.coli* O157: H_7 إلى عشرة اضعاف في انكلترا والى مائة ضعف في اسكتلندا خلال المدة من 1986-1996 .

طورت العديد من الممرضات الشائعة ميكانيكيات مقاومة متعددة لمضادات الحيوية ومن بين هذه الممرضات بكتيريا *S.marcescens* و *E.coli* وقد عزلت سلالات من بكتيريا *E.coli* تقاوم 22 مضاداً من بينها مضادات الأمبنيم والسيفوتاكسيم والسفتازديم والسبروفلوكساسين والجنتامايسين والأزلوسلين .

إن دراسة تحليل تتابعات DNA لعوامل الضراوة أكد أنها تكتسب بالانتقال الأفقي للجينات وكما هو الحال في جينات مقاومة مضادات الحيوية فإن بعض جينات الضراوة تنتقل على بلازميدات أو ترانزبوزونات كما هو الحال في سموم بعض أنواع بكتيريا *Yersinia* و *Shigella* و *Salmonella* التي يشفر لها بلازميدياً، وسموم الكوليرا والدفتريا وسم الـ Cytotoxin لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* التي يشفر لها من قبل عاثي وهي تنتشر أفقياً متسببة في ظهور ممرضات جديدة حاملة لها .

تتكيف السلالات البكتيرية في بيئتها لنقل الجينات إلى أنواع أخرى فيمكن أن تنتقل الجينات من الخلايا التي تتواجد فيها إلى خلايا أخرى بالتحويل أو التأبير بالعاثي أو الاقتران، اضافة إلى

ذلك فهناك الحويصلات (Vesicles) الغشائية التي تعد طريقاً آخر لنقل الجينات في البكتيريا بالرغم من أن دورها الحقيقي غير معروف جيداً في التبادل الوراثي بين الانواع المختلفة في البيئة أو داخل جسم المضيف، وهي حويصلات غشائية تتحرر من سطوح بعض البكتيريا السالبة لصبغة غرام خلال النمو وتتكون من بروتينات ودهون مفسفرة و RNA و DNA يمكن أن تساهم في نقل عوامل الضراوة من الخلية الأم التي تحوي أنزيمات وسموم مثل البروتييز والفوسفولايبيز والهيمولايسين والفيروتوكسين، وتحوي الحويصلة على قطع DNA خطية وبلازميد (4.2–7.1 كيلو قاعدة)

عندما تبدأ سلالة بكتيرية معينة في تطوير المقاومة لمضادات الحيوية من البداية فأنها تحتاج وقت طويل قبل أن تشكل تهديد صحي خطير ، وأن الذي يسرع من هذه العملية بين السلالات والأنواع البكتيرية المختلفه هو أنتقال جينات المقاومة من خلال عدة طرق هي:

1 – **الأقتران** : يحدث أنتقال مباشر بين البكتريا عن طريق الأتصال الفيزيائي عبر الشعيرات الجنسية

2– **التحول:** يحدث أدمصاص (absorb) قطع DNA تحتوي على معلومات وراثية من البيئة الى البكتريا المستلمة

3– **التوصيل أو التأبير بالعاثي:** أنتقال DNA من بكتريا الى اخرى عبر العاثيات.

من الأمثلة على دور الانتقال الافقي في نشر الجينات أن جينات مقاومة التتراسايكلين تكون موجودة بين مختلف المجاميع البكتيرية فهناك جين *TetL* الموجود في بكتريا *Listeria* و *Enterococcus* و *Clostridium* و *Actinomyces* و *Bacillus* و *Streptococcus* و *Staphylococcus* ، ويوجد الجين *TetK* في بكتريا *Eubacterium* إضافة للأجناس آنفاً، ووجد أن كلا الجينين (*TetK, TetL*) توجد أصلاً في الانواع البكتيرية الموجودة في التربة والتي تعود لأجناس *Mycobacterium* و *Streptomyces* .

يعتقد كذلك أن بكتريا *Streptomyces* المنتجة لمضادات الحيوية هي مصدر بعض جينات المقاومة للأمينوكلايكوسايد، وقد وجدت هذه الجينات الآن في أنواع بكتيرية أخرى مما يؤكد انتشار جينات المقاومة لمضادات الحيوية بين البكتريا في البيئة، وكمثال على ذلك فإن الاكتينومايسيتات تقاوم مضادات الامينوكلايكوسايد التي تنتجها بعدة طرق وأهمها بمثيلة الـ 16S rRNA وهذه الميكانيكية تمنحها مستوى عالياً من المقاومة لهذه المضادات، ولم توصف هذه الميكانيكية في العزلات السريرية ، ثم وصف بلازميد يحمل صفة انتاج أنزيم methylase rRNA 16S في عزلات سريرية لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* في اليابان ، وفي سنة 2004 عزلت بكتريا *S.marcescens*

مقاومة وبنسبة عالية للأمينوكلايكوساید ومن ضمنها مضاد arbekacin (المقاوم للتحوير بـأنزيم AAC أو غيـره مـن انزيمـات التحـوير) إضـافة لمضـادات الآميكاسـين والتوبرومايسـين والجنتامايسـين، فوجـد أنهـا تملـك جينـاً مشـفراً لأنـزيم 16S rRNA methylase وهو يشبه في تتابعه الجين المشفر لهذا الانزيم المنتج من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة 82% وجين الاكتينومايسيتات بنسبة 100%، وقد وجد أن هذا الجين محمول على بلازميد كبير الحجم غير اقتراني يمكن أن ينتقل إلى بكتيريا *E.coli* بالتحويل مما يزيد من المقاومة لمضادات الامينوكلايكوساید في العزلات السريرية، ومثال آخر على أهمية الانتقال الافقي للجينات وجد بعض الباحثين نوع من أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (نوع CTX-M) بين عزلات بكتيريا *Citrobacter freundii* هي $CTX\text{-}M_3$ في وارشو سنة 1996، ثم لوحظ انتشارها بين أعوام 1996–1997، بعد ذلك وفي سنة 1998 عزلت بكتريا *Enterobacter cloacae* منتجه هذا الانزيم ($CTX\text{-}M_3$) في أحدى المستشفيات في فرنسا، ثم عزلت سلالة *E.coli* منتجة لنفس الانزيم في تايوان، وفي عام 2002 وجـد ان أنـزيم $CTX\text{-}M_3$ بـين عـزلات *Serratia marcescens* و *Klebsiella pneumonia* في بولندا، ووجد أن هذا الانزيم الفعّال في تحليل سيفالوسبورينات الجيل الثالث يشفر له بجين على بلازميد كبير اقتراني متماثل في هذه العزلات بعد دراسته وراثياً مما يؤكد انتقال هذا البلازميد أفقياً وبالتالي نشر صفة المقاومة لمضادات السيفوتاكسيم والسفتازديم بين الأجناس المختلفة وفي مناطق جغرافية مختلفة، مما يتطلب التعاون في مجال الدراسات الوبائية بين المستشفيات المختلفة.

وقد وجد أن أصل الجين CTX-M *bla* المشفر لأنزيم $CTX\text{-}M_3$ هو من بكتيريا جنس *Kluyvera* الموجوده في البيئة وهو محمول على الكروموسوم في هذا الجنس مما يوضح انتقاله بين الكروموسوم والبلازميد بين مختلف الأجناس البكتيرية.

أن دراسة نسق (Pattern) توزيع جينات المقاومة لمضادات الحيوية يعد أمرا مهما ، أذ ان التركيز على حركة جينات المقاومة بين الأجناس البكتيرية التي يمكن ان تنتقل من الحيوانات الى الأنسان يكون ضروري ، كذلك يجب الأهتمام بالأنواع البكتيرية غير المرضية التي تنتقل بواسطة الغذاء من الحقل الى المستهلك وبالتالي يمكن ان تنقل جينات المقاومة الى البكتريا المعوية في الأنسان. تحصل زيادة المقاومة بأكتساب جينات من البكتريا التي تمر خلال القناة المعويـة وبالتـالي تـؤثر علـى صـحة الأنسـان ممـا يعيـد الأهتمـام بفرضـية الخـازن (reservoir hypothesis) التي تفترض ان البكتريا المتعايشه في أمعاء الأنسان من ضمنها غير المرضية والأنتهازية تتبادل DNA فيما بينها وتكتسب DNA من بكتريا تمر بالقناة الهضمية ولا تستطيع ان تستوطن الأمعاء أنما تقضي وقت في الأمعاء يكون كافيا لنقل DNA.

يحصل هذا التبادل في المادة الوراثية بين أنواع بعيدة عن بعضها من الناحية التطورية من عوائل مختلفة خاصة عن طريق الأقتران الذي يعبر حاجز الأجناس و Phylum مما يشكل خطورة ناتجة من أنتقال جينات المقاومة الى بكتريا قادرة على ان تسبب أمراض للأنسان .

الجين المنتقل يجب ان يمتلك تماثل بنسبة تفوق 95 % بين الأنواع التي ينتقل لها كمثال انتقال جين *ermG* المسؤول عن مقاومة مضادات الماكروليد من بكتريا *Bacteroides* الى *Bacillus* او *Clostridium* او *Staphylococcus* وبالعكس رغم ان هذه الأجناس بعيدة عن بعضها ، منها اجناس سالبة واخرى موجبة لصبغة كرام .

يعد الضغط الأنتخابي عاملا مهما في تطور مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية ، خير مثال على ذلك أنتخاب البكتريا المقاومة في الأمعاء والأماكن الأخرى في جسم الأنسان أذ تصبح البكتريا الطبيعية في الأمعاء (Flora) الى مقاومة لمضادات الحيوية والتي يمكن بدورها أن تمرر جينات المقاومة الى البكتريا المرضية .

وجد الباحثين ان أحد أنواع البكتريا الشائعة في الجبن غير المبستر (*Lactococcus lactis*) تمتلك جينات تشفر لمقاومة مضادات الستربتومايسين والتتراسايكلين والكلورمفنكول والأرثرومايسين ، وقد أظهرت نتائج تحليل تتابعات DNA أن هذه البكتريا غير المرضية أكتسبت جينات مقاومة المضادات من بكتريا أخرى مثل *S. aureus* و *Streptococcus pyogenes* و *Listeria monocytogenes* . يتبين من ذلك ان جينات المقاومة يمكن ان تنتقل سريعا من خلية بكتيرية الى أخرى داخل الحيوان او خلال عمليات تصنيع وانتاج الأغذية ، كذلك بينت بعض الدراسات ان بعض البكتريا ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية يمكن ان تنتقل من حيوانات الحقل الى الأنسان ، أذ تستعمل المضادات في الزراعة لغرض تشجيع نمو الحيوانات ، وتنتقل كذلك من خلال حركة الطيور البرية والقوارض والمياه الملوثة بالمضادات ،فقد وجدت تراكيز عاليه من مضادات الحياه في بعض مصادر المياه ومن خلالها يمكن ان تنتقل الى مكان اخر لم يسبق أن أستعملت فيه هذه المضادات ،أي ان المضادات التي تستعمل في المستشفيات والزراعة يمكن ان تنتقل الى المياه ثم الى النباتات المعاملة بالمياه الثقيله (Swege) او المياه المأخوذه من فضلات الحيوان والتي تستعمل في تسميد بعض المحاصيل والخضراوات مما يؤكد ان المضادات يمكن ان تنتقل الى مواقع لا تستعمل فيها، وهذا الأستعمال الواسع للمضادات ساهم في أصابة الأنسان ببكتريا صعبة العلاج ، الأمر الذي يبين أهمية الدراسات المسحية حول انتشار جينات مقاومة مضادات الحيوية في البيئة.

ساد الاعتقاد لعدد من السنين ان حركة الجينات بين البلازميدات والكروموسوم ناتجة عن التأشب (Rcombination) أعتمادا على ناتج الجين *recA* الذي يسمح بتبادل المعلومات الوراثية بين الانواع القريبة. أتضح بعد ذلك ان انتقال المادة الوراثية بين البلازميدات

والكروموسوم في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام لايقتصر على التأشب المعتمد على جين *rec* A انما هناك الجينات القافزة (Transposons) التي تغرز نفسها في مواقع مختلفة في الجينوم والتي تكون غالبا غير متجانسة (non-homologous) والمعروف ان عملية Transposition تكون نادرة تحدث 1 لكل 10^5 او 10^7 خلية \جيل .

تحمل جينات مقاومة مضادات الحيوية على قافزات (ترانزبوزونات) مركبة (Composite) مثل Tn*9* تشفر لمقاومة الكلورامفينكول بواسطة أنزيم Chloramphenicol acetyle transferase. يحوي Tn*3* على جينات تشفر لأنزيمات البيتالاكتاميز المسؤولة عن مقاومة مضادات البيتالاكتام.

تنظم جينات مقاومة المضادات في بعض الترانزبوزونات بتركيب يدعى integron وهو يتالف من جين *int* الذي يشفر لانزيم integrase وواحد او اكثر من حافظة جينية (gene cassettes) وكل حافظة من هذه تحتوي جين مقاومة مضادات وموقع للتأشب يدعى 59 base pair element وهو يقع في بداية الجين .

هناك جينات مقاومة مضادات تكون مرتبطة بالترانزبوزون لاتكون كحافظة (cassette) تتحرك مع بقية الترانزبوزون ويمكن ان ينغرز اساسا في اي مكان داخل جينوم البكتريا (بلازميد او كروموسوم).

لاتستطيع الترانزبوزونات أعلاه نقل الجين بذاتها بعملية الاقتران بين الخلايا البكتيرية ، لكن هناك نوع اخر من الترانزبوزونات هي الاقترانية (conjugative transposons)(CTn) تستطيع ان تلتحم داخل كروموسوم البكتريا ، ويمكن ان تنفصل عن الكروموسوم وتنتقل الى البكتريا المستلمة بعملية الاقتران بين الخلايا . الترانزبوزونات الاقترانية موجودة بشكل واسع في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وتعمل على نشر المقاومة لمضادات الحيوية بين الممرضات المهمة مثل *Streptococcus* و*Enterococcus*. شخصت الترانزبوزونات الاقترانية في البكتريا السالبة لصبغة كرام في البداية في جنس *Bacteroides* الموجودة بنسبة 25-30% من فلورا القناة الهضمية في الانسان ، تحمل هذه الترانزبوزونات جينات مقاومة للمضادات والموجودة في أجناس البكتريا السالبة لصبغة كرام الاخرى مثل *Proteus* و *Vibrio* و *Salmonella* يعد الترانزبوزون الأقتراني Tn*916* يحمل صفة مقاومة التتراسايكلين على كروموسوم بكتريا *Enterococus faecalis* (كانت تدعى *Strepococcus feacalis*) ثم وجد في بلازميدات وفي كروموسوم بكتريا اخرى مستقبلة لترانزبوزون Tn*916* .

يوجد Tn*1545* في بكتريا *Strepococcus pneumonia* وهو مسؤول كذلك عن مقاومة التتراسايكلين اضافة للارثرومايسين والكانامايسين. يختلف أنتقال الترانزبوزونات الاقترانية من خلية الى اخرى عن انتقال بلازميد R أذ لا يظهر للأهداب السطحية دور في نقلها .

هناك ترانزبوزونات متحركة (Mobilizable Transposons) (MTns) تنتقل بمساعدة CTn .

في دراسة اجريت على مجموعتين من سلالات بكتريا *Bacteroides* ، عزلت أحدهما قبل سنة 1970 والثانية عزلت بعد 1990 ، أحدى المجموعتين مرضية والثانية عزلت من أشخاص أصحاء، أظهرت كلا المجموعتين نفس نسق جينات المقاومة للمضادات ،لكن كان هناك أختلاف لافت للنظر أذ وجد ان نسبة قليلة جدا من السلالات القديمة (قبل 1970) تملك جينات *tetQ* (مقاومة التتراسايكلين) و *erm* (مقاومة المايكروليد) مقارنة بالسلالات المعزولة بعد سنة 1990 الفترة التي أزدادت فيها نسبة استعمال مضادات الحيوية .

النسبة العالية من العزلات التي تحمل جين *tetQ* والتي عزلت في الفترة بعد سنة 1990 كانت منها عزلات من أناس لم يستعملوا مضادات الحيوية مما يكشف ان هذا الجين أكتسب وقد أنتقل على CTn (CTnDoT) وهو ثابت جدا ربما أنفصل وأنتقل نتيجة تعرض البكتريا لمضاد التتراسايكلين . أذ يستعمل هذا المضاد بشكل واسع لعلاج أصابات الحيوانات وفي الزراعة لتحفيز نمو الحيوان ، وان هذا الأستعمال الواسع ولمدة طويلة قد يكون مسؤولا عن زيادة حمل جين *tetQ* في الفترة بين 1970–1990 . لا يقتصر هذا الأنتشار الواسع على جين مقاومة التتراسايكلين انما أنتشرت كذلك جينات *erm* خاصة *ermB* و *ermF* و *ermG* في الفترة الزمنية نفسها ، كشفت بعض الدراسات حديثا ان سلالات بكتريا *Bacteroides* في قولون الأنسان تحمل جينات *ermB* و *ermG* .

وجد الباحثين ان الترانزبوزون الأقتراني الحامل لجين *ermB* (CTnBST) موجود في بكتريا *Bacteroides* ويكون محمول على قطعة DNA بحجم 7K.b.p .

من جانب اخر وجد حديثا ان الجين *tetM* المسؤول عن مقاومة التتراسايكلين في البكتريا الموجبة لصبغة كرام موجود في بكتريا *E.coli* ويكون محمول عل CTn .

كذلك وجد ان بعض جينات المقاومة الموجودة في بكتريا فم وقولون الأنسان موجودة نفسها في خروج الحيوانات كمثال على ذلك جينات *tetQ* و *ermB* ، وجد الجين *tetQ* في بكتريا عزلت من أمعاء الابقار سنة 1990 ، يكون هذا الجين غير موجود على CTn انما محمول على بلازميد ، ووجد ان تتابعات القواعد النايتروجينية لهذا الجين متطابقة مع جين *tetQ* المعزول من بكتريا قولون الأنسان .

وجد ان الجين المشفر لأنزيم Methyl transferase (جين *armA*) المسؤول عن مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسايد موجود في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* ثم وجد في انواع مختلفة من العائلة المعوية ويكون محمول على بلازميد من خلال ترانزبوزون مركب مرتبط مع

جينـات مقاومـة مضـادات ستربتومايسـين و سـلفونومايد وترايمثـوبريم عزلـت هـذه البكتريـا مـن مستشفيات في اوربا ، ووجد أن أصل هذه الجينات هو من الأكتينومايسيتات في التربة .
هناك أنواع أخرى من أنزيمات Methyl transferases وجدت في البكتريا السالبة لصبغة كـرام ،علـى سـبيل المثـال وجـد ان أنـزيم RmtA (المشـفر بجـين *rmtA*) فـي بكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسايد المعزولة من مستشفى في اليابان ، وقد وجد انه متماثل بنسبة 30–35 % في الأحماض الأمينية للأنزيم RmtA في الأكتينومايسيتات.

4) بلازميد المقاومة R

يعد الاقتران البكتيري المعتمد على بلازميد R ميكانيكية أساسية لأنتشار مقاومة المضادات في المجتمعات البكتيرية السالبة لصبغة كرام . ينفصل بلازميد R عن الكروموسوم وهو يتالف من جزئين مرتبطين ببعض:
1– جينات تحفز وتسيطر على عمليات الاقتران (RTF)(Resistance Transfer Factor)
2– جينات مرتبطة وغالبا توجد مع معقد ترانزبوزون – انتكرون تشفر لمقاومة مضادات الحيوية (r-determininت)

يشبه بلازميد R الكامل بلازميد F' لحمله مواد وراثية أضافية . يعزل من البكتريا المضيفة بشكل DNA حلقي (سواء الشكل الدائري المغلق او المقطوع) . يعتمد طول البلازميد ووزونه الجزيئي بشكل كبير على البكتريا المضيفة وظروف الزرع اضافة الى الطريقة المستعملة في عزلة. يكون أنفصال بلازميد R الى جزيئين هما RTF و r-determininت عادة شائع في الانواع *Proteus mirabilis* و *Salmonella typhimurium* بينما يكون الانفصال نادرا في بكتريا *E.coli*. يعتمد الانفصال على فعالية ترانزبوزون ينغرز في موقع الأتصال بين المنطقتين. يتراوح الوزن الجزيئي لمنطقة الأقتران في بلازميد R بين 50×10^6 الى 60×10^6 كيلو دالتن وهي اكبر بكثير من جينات مقاومة المضادات ، على سبيل المثال يكون الوزن الجزيئي لجينات مقاومة الكلورمفنيكول والستربتومايسين والسلفونومايد 12×10^6 كيلو دالتن فقط.
يعتمد عدد نسخ بلازميد R في البكتريا المفردة على خواص البلازميد والمضيف اضافة الى ظروف الزرع.

يكون بلازميد R الكبير الحجم ذا عدد محدود (1-4 نسخة) لكل كروموسوم في بكتريا *E.coli* بينما يكون العدد في بكتريا *Proteus mirabilis* متغاير أكثر حتى في اطوار النمو .

أن مستوى مقاومة الخلية لا يعتمد دائما على عدد نسخ جينات المقاومة فعلى سبيل المثال توجد نسخ عديدة لبلازميد R في بكتريا *P. mirabilis* بصورة اكبر مقارنة ببكتريا *E.coli* بينما يكون مستوى المقاومة في بكتريا *E.coli* للمضادات اكبر من بكتريا *P. mirabilis*.

5-1 الاقتران البكتيري وانتقال بلازميد R

يعد الاقتران البكتيري من اكثر الطرائق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة والضراوة وبصورة سريعة بين المجموعات البكتيرية ، وهو يحدث بمدى واسع من المضائف بميكانيكيات غير معروفة تماماً.

يحصل الاقتران بتكرار عالٍ بين البكتيريا من نفس النوع أو الأنواع القريبة مقارنة مع الانواع الأخرى الأبعد وراثياً، لكن هذا لايعني بالضرورة أن السلالات المتشابهة أو الانواع القريبة يجب أن تكون مانحات أفضل من السلالات البعيدة فهو يحصل بين الخلايا المانحة والمستلمة من مختلف العوائل أو حتى من مختلف الممالك (Kingdoms) ، ويحصل بين البكتيريا في مياه البحار أو المياه العذبة وفي التربة والرايزوسفير وفي المضائف مثل الانسان.

يعتمد الاقتران على وجود البلازميدات الاقترانية والتي تحمل الجينات المطلوبة لعملية الاقتران، وهناك حقيقة تعدد مضائف البلازميدات والتي يطلق عليها بالبلازميدات المختلطة (Promiscous plasmids) التي تنتقل وتكسر حاجز الانواع منتقلة بين الانواع البعيدة عن بعضها تطورياً.

تمتلك الخلايا البكتيرية الحاوية بلازميد R (R+) القابلية على تكوين لاحقة سطحية تعرف بـ sex pili ، تشبه هذه اللاحقة الجنسية تلك التي تنتج من خلايا F^+ وعند خلط خلايا R^+ مع R^- تتكون ازواج الخلايا المقترنة بواسطة تداخل سطحي يشمل تكوين sex pili ، ثم تنتقل نسخة من بلازميد R من خلاياR^+ الى خلايا R^- وتتحول خلايا R^- الىR^+ ويمكن ان تنتقل صفة مقاومة المضادات سريعاً بهذه الطريقة بين المجتمعات البكتيرية . أزواج الخلايا المقترنة بأتصال بواسطة اللاحقة الجنسية التي تمتد من الخلايا R^+ المانحة الى المستلمة R^- هذا التداخل بين الخلايا يعطي اشارة الى بلازميد R في الخلية المانحة في نقطة اصل ألانتقال(Ori T) ، يحصل قطع لاحد الشريطين وهو شريط T غير ملتف ثم ينتقل من الخلية المانحة الى المستلمة وهو يحمل معه جينات مثل الجينات المشفرة للسموم وبروتينات الضراوة . تشير الدراسات الحديثة الى انه عند تكوين شريط T فان بروتين relaxase (Trwc) تعمل كقائد يقود شريط T الى داخل type 4 secretory .

البـــــــــــــروتين الاخـــــــــــــر TrwB يـــــــــــــدفع بشـــــــــــــريط DNA T خلال نظام معين، وتبقى تفاصيل النقل النهائي داخل الخلية المستقبلةً . يعمل أنزيم DNA polymerase نوع 3 على مضاعفة DNA فينتج DNA بلازميدي مزدوج الشريط من جزيئه مفردة الشريط في كلا الخليتين المانحة والمستقبلة.

ان تكرار انتقال بلازميد R اقل من تكرار انتقال بلازميد F ، وتثبط اللاحقة الجنسية المتكونة عن بلازميد R نتيجة تراكم البروتينات على عكس اللاحقة المتكونة في الخلايا F^+ اذ لا تقع تحت سيطرة التثبيط او الكبح (repressor control) .

بلازميد R هو بلازميد منتقل ذاتيا، هناك بلازميدات تحمل جينات مقاومة مضادات الحيوية لكن لاتمتلك القدرة على حصول عملية الاقتران وهي تنتقل الى الخلايا المستلمة عند وجود بلازميد أقتراني معها في نفس الخلية (*trans* mobilization) او بواسطة الالتحام مع بلازميدات اقترانية متحركة (*cis* mobilization) ، ويضيف هذا التعاون بين البلازميدات صفات وراثية جديدة للبكتريا ويزيد من قابلية انتشار مقاومة مضادات الحيوية بين المجتمعات البكتيرية.

2-5 الاهمية الطبية لبلازميد R

من المعروف ان بلازميدات R كانت موجودة في الخلايا البكتيرية قبل تطور المضادات البكتيرية الحديثة، وقد تطورت مقاومة البكتريا للمضادات والمتسببة عن بلازميدات R بعد الانتشار الواسع العشوائي لهذه المضادات ، وذلك واضح في الحيوانات الحقلية التي تعطى مضادات حيوية مع الاغذية ، فتعمل هذه الحيوانات كمخازن للبكتريا المعوية مثل *E.coli* و *Salmonella typhimurium* الحاملة لبلازميدات R والتي تنتقل بكفاءة الى الانسان. بعض الممرضات مثل *E.coli* المسببة لاصابات الاطفال ممكن ان تكون مقاومة لمضادات البيتالاكتام والستربتومايسين والنيومايسين والكلورمفنيكول والتتراسايكلين .
تمتلك بكتريا التايفوئيد (*Salmonella typhi*) بلازميد R حامل جينات مقاومة الكلورمفينكول و Co-trimoxazole وهي المضادات التي تستعمل عادة لعلاج هذه الاصابة . هناك عوامل
بيئية تؤثرعلى أنتقال بلازميد R الى الخلايا المستلمة ففي بيئة القناة المعوية تكون الفعالية الاقترانية لبكتريا R^+ اقل من تلك المزروعة في المختبر.

5-3 دور Transduction في نقل مقاومة مضادات الحيوية

يمكن ان تنتقل المعلومات الوراثية عن طريق العاثي في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام من خلية بكتريا الى اخرى. يمكن أن تعبأ قطع DNA بلازميد او كروموسوم المضيف والتي قد تحمل جينات مقاومة مضادات الحيوية داخل جسيمات العاثي المتولدة الجديدة ,وبعد تحرير العاثيات بدورة lytic يمكن ان تلتحم في جينوم جديد للخلية المستلمة.وهناك 70 او 90% من DNA المنتقل لا يلتحم بهذه الطريقة ، وهذا DNA غير الملتحم يمكن ان يخدم الخلية المستلمة ويكون كبلازميد في النقل المجهض (obortive) ويظهر الطراز المظهري لمقاومة مضادات الحيوية في كلا النوعين من النقل. تعتمد عمليات التوصيل المتخصص على الخطأ في دورة Lysogenic ، يحتوي ناتج جينوم العاثي على10 % من DNA البكتيري قبل التحام العاثي في جينوم البكتريا ، وهذه العملية تكون كفؤة في توليد جسيمات عاثيات مصيبة تحمل جينات بكتيرية متخصصة بمقاومة مضادات الحيوية ويمكن ان تنقلها الى خلايا اخرى.

5-4 دور التحول Transformation في نقل مقاومة مضادات الحيوية

تستطيع أغلب الخلايا البكتيريه تحت ظروف معينة من أدمصاص (absorb) قطع DNA تحتوي على معلومات وراثية تتضمن مقاومة مضادات الحيوية ، البكتريا المؤهلة فقط لها القدرة على أدمصاص ودمج DNA الخارجي في جينومها وبالرغم من ان عملية التحول ظاهرة واسعة الانتشار لكن هناك أختلافات في تفاصيل الميكانيكيات بين الأنواع البكتيرية ، يكون تكرار حدوث التحول في الجينات 10^3 في ظروف المختبر عندما يكون مستوى DNA عالي (يضاف اصطناعياً) أي ان كل خلية واحدة من الف خلية تلتقط جين وتدخله ضمن جينومها وهذا الجين يعمل على نشر صفة مقاومة مضادات الحيوية , كمثال جينات الموزائيك (mosaic genes) لأنزيمات PBPs المسؤولة عن مقاومة مضادات البيتالاكتام، والجينات المشفرة لانزيم DHPS المسؤول عن مقاومة مضادات السلفونومايد ، وجين *tetM* المسؤول عن مقاومة التتراسكلين .

يحدث التحول في القناة المعوية او في المستشفى والبيئة. أضافة لأنتقال مقاومة المضادات عن طريق العناصر الوراثية المتحركة فان صفة المقاومة

المتعددة للمضادات في البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكن ان تنتقل بوسائل اخرى. هناك جينات regulons تشفر لمقاومة بعض المضادات بواسطة تقييد اهدافها الجزيئية.

المصادر

(المستعملة والأخرى للمطالعة)

1) Finlay , J; Miller,L. and Poupard ,J.A. (2003). A review of the antimicrobial activity of clavulanate . J. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 18-23

2) Beceiro, R.; Lopez-Rojas,R. ; Dominguez-Herrera, J.; Docobo-Perez,F. ;Bou,G.; Pachon,J. and the Spanish Network for Research in InfectiousDis. (2009). *In Vitro* Activity and *In Vivo* Efficacy of Clavulanic Acid against Acinetobacter baumannii J.Antimicrob. Agents Chemother., October 1; 53(10): 4298 - 4304.

3**)** Conly,J**.** (2002). Antimicrobial resistance in Canada CMAJ .15; 167 (8).

4) Nicolle,L. ; Conly ,J. M. and MacDonald, N.(2009). Embracing ecology to limit antimicrobial resistance Can. Med. Assoc. J. , 180(4): 371 - 372.

5)Mulvey,M.R.and.Simor,A.E (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? Can. Med. Assoc. J.,180(4): 408 - 415.

6) Patrick, D. M. and Hutchinson, J. (2009). Antibiotic use and population ecology: How you can reduce your "resistancefootprint"Can. Med. Assoc. J., 180(4): 416 - 421.

7) Cowie, S. E. ; Ma, I.; Lee, S. K. ; Smith, R. M. and Hsiang, Y. N. (2005).Nosocomial MRSA Infection in Vascular Surgery Patients: Impact on Patient Outcome Vascular and Endovascular Surgery, 39(4): 327 - 334.

8) Webber, M. A. and Piddock, L. J. V (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance J.Antimicrob. Agents Chemother., 51, 9-11.

9) Vecchione, J. J. ; Alexander, B.; and Sello, J. K. (2009). Two Distinct Major Facilitator Superfamily Drug Efflux Pumps Mediate Chloramphenicol Resistance in Streptomyces coelicolor J.Antimicrob. Agents Chemother., 53(11): 4673 - 4677.

10) Hu, W. S.; Lin, J.F. ; Lin, Y.H. and Chang H.-Y., (2009). Outer Membrane Protein STM3031 (Ail/OmpX-Like Protein) Plays a Key Role in the Ceftriaxone Resistance of Salmonella enterica Serovar Typhimurium J.Antimicrob. Agents Chemother., 53(8): 3248 - 3255.

11) Spies, F. S. ; Almeida da Silva, P. E. ; Ribeiro, M. O. ; Rossetti, M. L. andZaha,A.(2008).Identification of Mutations Related to Streptomycin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and Possible Involvement of Efflux Mechanism J.Antimicrob. Agents Chemother., 52(8): 2947 – 2949.

12) Quinn, T.; Bolla, J.M. ; Pages, J.M. and Fanning, S. (2007).Antibiotic-resistant Campylobacter: could efflux pump inhibitors control infection? J. Antimicrob.Agent Chemother., 59(6): 1230 - 1236.

13) Aizen,E. ; Ljubuncic,Z.; Ljubuncic,P.; Aizen,I. and Potasman,I. (2007). Risk Factors for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in a Geriatric Rehabilitation Hospital . J of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 62:1152-1156.

14) Park,Y. ; Lee ,S.; Kim ,Y.R.; Oh,E.J.; Woo , G.J. and Lee,K. (2006). Occurrence of extended-spectrum ß-lactamases and plasmid-mediated AmpC ß-lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis* .J. of Antimicrob.Agent Chemother. 57(1):156-158.

15) Aragon, L. M. ; Mirelis,B. ; Miro,E.; Mata,C.; Gomez,L.; and Navarro,F.(2008).Increase in {beta}-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type {beta}-lactamases J. Antimicrob. Chemother., 61(5): 1029 - 1032.

16) Baudry,P.J.; Nichol, K.; DeCorby, M.; Mataseje, L.; Mulvey, M.R.; Hoban, D.J. and Zhanel , G.(2008). Comparison of Antimicrobial Resistance Profiles among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing and Acquired AmpC β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Canadian Intensive Care Units .,J. Antimicrob. Agents Chemother. 52(5): 1846–1849.

17) Laurent Poirel, L.; Olivier Menuteau, O.; Agoli, N. ; Cattoen, C. and Nordmann , P. (2003). Outbreak of Extended-Spectrum β-Lactamase

VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital, J Clin Microbiol., 41(8): 3542–3547.

18) (2007) HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY

by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey

19) (2005). Handbook of Antimicribial therapy ., 17 ed. New Rochelle, New York.

20) Guilfoile,P.G.(2007). Antibiotic-Resistant Bacteria. Chelsea House, United States of America.

21) Russell ,W. and Helwald ,H. (2005). Concepts in Bacterial Virulence **,** Vol. 12, Library of Congres.

22) B i r g e , E.A. (2006). Bacterial and Bacteriophage Genetics .(F i f t h ed.). Printed in the United States of America.

23) Zimmerman, S.B. (2003). Underlying regularity in the shapes of nucleoids of *Escherichia coli*: Implications for nucleoid organization and partition. J. of Structural Biology 142: 256–265.

24) Hatfull, G.F. and Jacobs, Jr.; W.R. (eds.) (2000). Molecular Genetics of Mycobacteria. Washington, DC: ASM Press.

25) Delagoutte, E. and von Hippel, P.H. (2003). Helicase mechanisms and the coupling of helicases within macromolecular machines. Part II: Integration of helicases into cellular processes. Quarterly Reviews of Biophysics 36: 1–69.

26) Draper, G.C. and Gober, J.W. (2002). Bacterial chromosome segregation. Annual Review of Microbiology 56: 567–597.

27) Giraldo, R. (2003). Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: Combined structural, functional and phylogenetic perspectives. FEMS Microbiology Reviews 26: 533–554.

28) Kornberg, A. (2003). Enzymatic Synthesis of DNA. Temecula, CA: Textbook Publishers.

29) Messer, W. (2002). The bacterial replication initiator DnaA, DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. FEMS Microbiology Reviews 26: 355–374.

30) Margolin, W. (2003). Bacterial division: The fellowship of the ring. Current Biology 13: R16–R18.

31) Murray, N.E. (2002). Immigration control of DNA in bacteria: Self versus nonself. Microbiology 148: 3–20.

32) Pogliano, K.; Pogliano, J. and Becker, E. (2003). Chromosome segregation in eubacteria .Current Opinion in Microbiology 6: 586–593.

32) Hersh, M.N.; Ponder, R.G.; Hastings, P.J. and Rosenberg, S.M. (2004). Adaptive mutation and amplification in Escherichia coli: Two pathways of genome adaption under stress. Research in Microbiology 155: 352–359.

33) Maki, H. (2002). Origins of spontaneous mutations: Specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. Annual Review of Genetics 36: 279–303.

34) Bertrand, C.; Prere, M.F.; Gesteland, R.F.; Atkins, J.F.and Fayet, O. (2002). Influence of the stacking potential of the base 3’ of tandem shift codons on –1 ribosomal frameshifting used for gene expression. RNA 8: 16–28.

35) Bharatant, S.M.; Reddy, M.N. and Gowrishankar, J. (2004). Distinct signatures for mutator sensitivity of lacZ reversions and for the spectrum of lacI/lacO forward mutations on the chromosome of nondividing Escherichia coli. Genetics 166: 681–692.

36) Bjedov, I.; Tenaillon, O.; Gérard, B.; Souza, V.; Denamur, E.; Radman, M.; Taddei, F. and Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. Science 300: 1404–1409.

37) Cairns, J. and Foster, P.L. (2003). The risk of lethals for hypermutating bacteria in stationary phase. Genetics 265: 2317–2318.

38) Hosaka, T.; Tamehiro, N.; Chumpolkulwong, N.; Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M.; Yokoyama, S. and Ochi, K. (2004). The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genomics* 271: 317–324.

39) Gowrishankar, J. and Harinarayanan, R. (2004). Why is transcription coupled to translation in bacteria? *Molecular Microbiology* 54: 1365–2958. McGlynn, P., Lloyd, R.G. (2002). Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. *Trends in Genetics* 18: 413–419.

40) Schofield, M.J. and Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: Molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology* 57: 579–608.

41) Coates ,H.Y. (2005). Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli* . FEMS Microbiol Lett 243:117-124.

42) Diggle, S. P.; Winzer,K. ; Chhabra,S.R. *et al*. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Molec. Microbiol. 50: 29–43.

43) Storz, G.; Opdyke,J.A. and Zhang,A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. Curr. Opin. Microbiol. 7: 140–4.

44) McNab, R.; Ford, S. K.; El-Sabaeny,A. *et al*.(2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with Porphyromonas gingivalis. J. Bacteriol. 185: 274–84.

45) Merritt, J.; Qi, F.; Goodman, S. D. ; Anderson, M. H. and Shi, W. (2003). Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans.* Infect. Immun. 71: 1972–9.

46) Sircili, M. P., M. Walters, L. R. Trabulsi and V. Sperandio. 2004. Modulation
of enteropathogenic Escherichia coli virulence by quorum sensing. Infect. Immun.

72: 2329–37.

47) Chan, V.L. ; Sherman,P.M.and Bourke,B. (2006) Bacterial Genomes and Infectious Diseases Humana Press Inc.

48) Lindsay, J. A. and Holden, M. T. (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* **12,** 378–385.

49) Mackiewicz, P. ; Zakrzewska-Czerwinska, J.; Zawilak, A.; Dudek, M. R., and Cebrat, S.(2004) Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region. *Nucleic Acids Res.* **32,** 3781–3791.

50) Eppinger, M.; Baar, C.; Raddatz, G.; Huson, D. H.; and Schuster, S. C. (2004) Comparative analysis of four Campylobacterales. *Nat. Rev. Microbiol.* **2,** 872–885.

51) Nierman, W. C.; DeShazer, D.; Kim, H. S., *et al*. (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14,246–14,251.

52) Salama, N. R., Shepherd, B., and Falkow, S. (2004) Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori. J. Bacteriol.* 186, 7926–7935.

53) Brennan, P. J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83, 91–97.

54) Zubrzycki, I. Z. (2004) Analysis of the products of genes encompassed by the theoretically predicted pathogenicity islands of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Proteins* 54, 563–568.

55) Kumar, A.; Bose, M., and Brahmachari, V. (2003) Analysis of expression profile of mammalian cell entry (*mce*) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71,** 6083 – 6087.

56) Li, M., Kotetishvili, M., Chen, Y., and Sozhamannan, S. (2003) Comparative genomic analyses of the vibrio pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic
serogroup strains of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. **69,** 1728–1738.

57) Meuwissen, S. G. M. (2001) The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insight in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* 36(Suppl 234), 29–40.

58) Selby, W. S. (2004) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteraemia in patients with inflammatory bowel disease. *Lancet* 364, 1013–1014.

59) Harry, E.; Monahan, L. and Thompson, L. (2006) Bacterial cell division: the mechanism and its precision. Int. Rev. Cytol. 253:27–94

60) Henkin, TM. and Yanofsky, C. (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. Bioessays. 24:700–707.

61) Higgins, NP. (2007) Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at Ter sites: what's the Dif? Mol. Microbiol. 64:1–4.

62) Krasny, L. and Gourse, RL. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. EMBO J. 23:4473–4483.

63) Kruse ,T.; Blagoev, B.; Lobner-Olesen, A.; Wachi, M.; Sasaki, K.; Iwai N, Mann M, and Gerdes, K. (2006) Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. Genes Dev. 20:113–124.

64) Murakami, KS. And Darst, SA. (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story. Curr. Opin. Struct. Biol. 13:31–39.

65) Neylon, C.; Kralicek, AV. ; Hill, TM. and Dixon, NE. (2005) Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69:501–526.

66) Harraghy ,N.; Kerdudou, S. and Herrmann, M. (2007) Quorum-sensing systems in staphylococci as therapeutic targets. Anal Bioanal Chem 387:437–444.

67) Helmann, JD. (2006) Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* σW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. Sci Prog 89:243–266

68) Helmann, JD. and Moran ,CP. (2002) RNA Polymerase and σ Factors. In: Sonenshein AL, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and Its Relatives: From Genes to Cells. ASM Press, Washington D.C., pp 289–312

69) Huletsky, A. *et al*. (2004). New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J. Clin. Microbiol. 42, 1875.

70) Warren, D.K.; *et al*.(2004) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol. 42, 5578,

71) Chongtrakool, P. (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* **(**SCC*mec***)** typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC *mec* elements. Antimicrob. Agents Chemother.50, 1001.

72) Vela, MC.; Fonseca, N.; Di Fabio, JL. and Castaneda, E.(2001) Presence of international multiresistant clones of *Streptococcus pneumoniae* in Colombia. Microb Drug Resist ;7:153–64.

73) Greenberg, D.; Dagan, R.; Muallem, M. and Porat, N. (2003) Antibiotic-resistant invasive pediatric *Streptococcus pneumoniae* clones in Israel. J Clin Microbiol;41:5541–5.

74) Dowson, CG. and Trzcinski, K.(2002) Evolution and epidemiology of antibiotic-resistant pneumococci. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW and Wax RG, eds. Bacterial Resistance to Antimicrobials. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., :265–293.

75) Talbot ,TR.; Poehling, KA.; Hartert, TV., et al.(2004). Reduction in high rates of antibioticnonsusceptible invasive pneumococcal disease in Tennessee after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. Clin Infect Dis;39:641–8.

76) Kyaw, MH.; Lynfi,R. ; Schaffner, W.; *et al*. (2006) Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. N. Engl. J. Med; 354:1455–63.

77) Kayhty, H.; Auranen, K.; Nohynek, H.; Dagan, R. and Makela, H. (2006) Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. Expert Rev Vaccines;5:651–67.

78) Temime, L.; Guillemot, D. and Boelle, PY.(2004). Short- and long-term effects of pneumococcal conjugate vaccination of children on penicillin resistance. J.Antimicrob Agents Chemother;48:2206–13.

79) Dagan, R. and Lipsitch, M. (2004) Changing the ecology of pneumococci with antibiotics and vaccines. In: Toumanen EI, Mitchell TJ, Morrison DA and Spratt BG, eds. The pneumococcus. 1 ed. Washington, D.C.: ASM Press,:283–331.

80) Wang, YC. and Lipsitch, M.(2006) Upgrading antibiotic use within a class: tradeoff between resistance and treatment success. Proc Natl Acad Sci USA;103:9655–60.

81) Bean, DC. and Klena, JD.(2005) Characterization of major clones of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in New Zealand by multilocus sequence typing. J Antimicrob Chemother ;55:375–8.

82) Lee, NY.; Song, JH.; Kim, S., *et al*.(2001) Carriage of antibiotic-resistant pneumococci among Asian children: a multinational surveillance by the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). Clin Infect Dis ;32:1463–9.

83) Normark, B.; Christensson, B.; Sandgren, A., *et al*.(2003) Clonal analysis of *Streptococcus pneumoniae* nonsusceptible to penicillin at day-care centers with index cases, in a region with low incidence of resistance: emergence of an invasive type 35B clone among carriers. Microb Drug Resist ;9:337–44.

84) Sener, B.; McGee, L.; Pinar, A., and Eser, O. (2006) .Genomic backgrounds of drug-resistant *Strepto coccus pneumoniae* in Ankara, Turkey: Identifi cation of emerging new clones. Microb Drug Resist ;12:109–14.

85) Yaro, S.; Lourd, M.; Traore, Y. *et al*.(2006) Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. Clin Infect Dis;43:693–700.

86) Altraja, A.; Naaber, P.;Tamm, E.; Meriste, S.; Kullamaa, A. and Leesik, H.(2006). Antimicrobial susceptibility of common pathogens

from community-acquired lower respiratory tract infections in Estonia. J Chemother ;18:603–9.

87) Jain, A.; Kumar, P. and Awasthi, S.(2005) High nasopharyngeal carriage of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus infl uenzae* in North Indian schoolchildren. Trop Med Int Health ;10:234–9.

88) Allen, UD.; Thomas, S.; Carapetis, J. *et al*.(2003) Serotypes of respiratory tract isolates of *Stretococcus pneumoniae* from Jamaican children. Int. J. Infect Dis ;7:29–35.

89) Bogaert, D.; Sluijter, M.; Toom, NL. *et al*.(2006) Dynamics of pneumococcal colonization in healthy Dutch children. *Microbiology* ;152:377–85.

90)Matute, AJ.; Brouwer, WP.; Hak, E.; Delgado, E.; Alonso, E. and Hoepelman, IM.(2006) Aetiology and resistance patterns of community-acquired pneumonia in Leon, Nicaragua. Int J Antimicrob Agents ;28:423–7.

91) Pedersen, MK.; Hoiby, EA.; Froholm, LO.; Hasseltvedt, V. Lermark, G. and Caugant, DA.(2001) Systemic pneumococcal disease in Norway 1995–2001: capsular serotypes and antimicrobial resistance. Epidemiol Infect ;132:167–75.

92) Murphy, OM.; Murchan, S. Whyte, D. *et al*. (2005) Impact of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System on the development of a national programme to monitor resistance in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in Ireland, 1999–2003. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;24:480–3.

93) Monaco, M.; Camilli, R. ;D'Ambrosio, F. ;Del Grosso, M. and Pantosti, A.(2005) Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J Antimicrob Chemother ;55:256–9.

94) Hjaltested, EK.; Bernatoniene, J.; Erlendsdottir, H. *et al*.(2003) Resistance in respiratory tract pathogens and antimicrobial use in Icelandic and Lithuanian children. Scand J. Infect. Dis. ;35:21–6.

95) Benbachir, M.; Benredjeb, S.; Boye, CS. *et al*.(2001) Two-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in four African cities. Antimicrob Agents Chemother ;45:627–9.

96) Borg, M.; Scicluna, E.; De Kraker, M. *et al*.(2006) Antibiotic resistance in the southeastern Mediterranean—preliminary results from the ARMed project. Euro Surveill ;11. 200.

97) Roca, A.; Sigauque, B.; Quinto, L. *et al*.(2006)Invasive pneumococcal disease in children 5 years of age in rural Mozambique. Trop Med Int Health ;11:1422–31.

98) Bean, DC.; Ikram, RB. and Klena, JD.(2004) Molecular characterization of penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Christchurch, New Zealand. J Antimicrob Chemother ;54:122–9.

99) Johnson, WB.; Adedoyin Tiemei, Z.; Xiangqun, F. and Youning, L.(2004) Resistance phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Beijing and Shenyang, China. Antimicrob Agents Chemother ;48:4040–1.

100) Ho, PL.; Lam, KF.; Chow, FK. *et al*.(2004) Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of nasopharyngeal and invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Hong Kong children. *Vaccine* ;22:3334–9.

101) Paraskakis, I.; Kafetzis, DA.; Chrisakis, A. *et al*.(2004) Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001–2004. Clin Microbiol Infect ;12:490–3.

102) Working Group of Tokai Anti-biogram Study Mitsuyama,G.; Yamaoka,J. K, *et al.* (2006) Sensitivity surveillance of *Streptococcus pneumoniae* isolates for several antibiotics in Gifu prefecture (2004). Jpn J. Antibiot ;59:137–51.

103) Ubukata, K.; Chiba, N.; Hasegawa, K.; Kobayashi, R.; Iwata, S. and Sunakawa, K.(2004) Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother ;48:1488–94.

104) Kariuki, S.; Muyodi, J.; Mirza, B.; Mwatu, W. and Daniels, JJ.(2003) Antimicrobial susceptibility in community-acquired bacterial pneumonia in adults. East Afr Med J ;80:213–7.

105) Al Sweih ; Hegde; S. S.; Vetting,M.W. ; Roderick,S.L.; Mitchenall,L. A.; Maxwell, H. E. ;Takiff,H. and Blanchard, J. S. (2005). A fl uoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science 308:1480–3.

106) Andries, K.; Verhasselt, J.; Guillemont, H. W.; Gohlmann, J. M.; Neefs, H. ;Winkler, J.; Van Gestel, P.; Timmerman, M.; Zhu, E. ;Lee, P.; Williams, D.; de Chaffoy, E.; Huitric, S.; Hoffner, E.; Cambau, C.; Truffot-Pernot, N.; Lounis,N. and Jarlier,V.(2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science 307:223–7.

107) Ibrahim, M.; Andries, K. ; Lounis, N.; Chauffour, A.; Truffot-Pernot, C. ; Jarlier, V. and Veziris, N.(2007). Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 51:1011–5.

108) Lounis, N.; Veziris, N.; Chauffour, A.; Truffot-Pernot, C.; Andries, K. and Jarlier ,V.(2006). Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potential to shorten treatment duration. Antimicrob Agents Chemother 50:3543–7.

109) Petrella, S. ; Cambau, E.; Chauffour, A.; Andries, K.; Jarlier, V. and Sougakoff, W.(2006). Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 50:2853–6.

110) Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H. ; Sasaki, H.; Shimokawa, Y. and Komatsu, M.(2006). OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis *in vitro* and in mice. PLoS Med 3:e466.

111) Walsh, TR.; Toleman, MA.; Poirel, L.; Nordmann, P.(2005) Metallo-□-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev ; 18(2):306–25.

112) Franklin, C.; Liolios, L. and Peleg, AY.(2006) Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol ; 44:3139–44.

113) Georgopapadakou, NH.(2004). Beta-Lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. Expert Opin Investig Drugs ; 13:1307–1318.

114) MGP Page.(2000) Beta -Lactamase inhibitors. Drug Resist Updates ; 3:109–125.

115) Stapleton, PD.; Shannon, KP. and French, GL.(1999) Construction and characterization of mutants of the TEM Beta-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to Beta-lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother ; 43:1881–1887.

116) Rahal ,JJ.; Urban, C.; Horn, D.; *et al*.(1998) Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. J .Am. Med. Assoc ; 280:1233–37.

117) Cosgrove, SE.; Qi, Y.; Kaye, KS.; *et al*.(2005) The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control Hosp Epidemiol ; 26 166–173.

118) Melzer, M.; Eykyn, SJ.; Gransden, WR. and Chinn, S.(2003) Is methicillin resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteraemia. Clin Infect Dis ; 37: 1453–1460.

119) Masterton, RG.(2000) Surveillance studies: can they help the management of infection? J Antimicrob Chemother ; 46: T2, 53–58.

120) Deshpande, LM.; Fritsche, TR.and Jones, RM.(2004) Molecular epidemiology of selected multi drug resistant bacteria: a global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. Diagn Microbiol Infect Dis ; 49: 231–236.

121) Mutnick, AH.; Rhomberg, PR.; Sader, HS. and Jones RN.(2004) Antimicrobial useage and resistance trend relationships from the MYSTIC Programme in North America (1999–2001).J. Antimicrob. Chemother. ; 53: 290–296.

122) Felmingham, D.; White, AR.; Jacobs, MR.; *et al*.(2005) The Alexander Project: the benefi ts from a decade of surveillance. J Antimicrob Chemother ; 56: Suppl 2: ii3–ii21.

123) Richet, HM.; Mohammed, J.; Mcdonald, LC. *et al*. (2001) Building Communication Networks: International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance (INSPEAR). Emerg Infect Dis; 7: 319–322.

124) Suttajit ,S.; Wagner, AK.; Tantipidoke, R. *et al*. (2005) Patterns, appropriateness, and predictors of antimicrobial prescribing for adults with upper respiratory tract infections in urban slum communities of Bangkok. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health; 36: 489–497.

125) Department of Health, UK. (2005) .Saving Lives: a delivery programme to reduce Health Care Associated Infections including MRSA. Department of Health, UK.

126) Lazzari, S.; Allegranzi, B. and Concia, E.(2004) Making hospitals safer: the need for a global strategy for infection control in health care settings. World Hosp Health Serv ; 40: 36–42.

127) Halstead, DC.; Gomez, N. and McCarter YS.(2004) Reality of developing a community wide antibiogram. J Clin Microbiol ; 42: 1–6.

128) Paine,K. and Flower DR.(2002) Bacterial bioinformatics: pathogenesis and the genome. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. ; 4: 357–365.

129) Rogers, BL.(2004) Bacterial targets to antimicrobial leads and development candidates. Curr Opin Drug Discov Devel ; 7: 211–222.

130) Simonsen ,GS.; Tapsall, JW.; Allegranzi ,B. *et al*.(2004) The antimicrobial resistance containmentand surveillance approach—a public health tool. Bull World Health Organ ; 82: 928–934.

131) Spiro, DM.; Tay, KY.; Arnold ,DH.; Dziura, JD. and Baker, MD. (2006) Shapiro, ED. Wait-and-see prescription for the treatment of acute otitis media: a randomized controlled trial. JAMA. ;296(10):1235–41.

132) Gonzales, R.; Steiner, JF.; Lum, A. and Barrett, Jr . (1999). Decreasing antibiotic use in ambulatory practice: impact of a multidimensional intervention on the treatment of uncomplicated acute bronchitis in adults. JAMA. ;281:1512–9.

133) Belongia, EA.; Sullivan, BJ.; Chyou, PH.; Madagame, E.; Reed, KD. and Schwartz, B. A.(2001) community intervention trial to promote judicious antibiotic use and reduce penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* carriage in children. Pediatrics. ;108(3):575–83.

134) Hennessy, TW.; Petersen, KM.; Bruden, D.; Parkinson AJ, Hurlburt D. Getty M, et al.(2002) Changes in antibiotic-prescribing practices and carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: A controlled intervention trial in rural Alaska. Clin Infect Dis. Jun 15;34(12):1543–50.

135) McCaig, LF.; Besser, RE. and Hughes, JM.(2003) Antimicrobial drug prescription in ambulatory care settings, United States, 1992–2000. Emerg Infect Dis. ;9(4):432–7.

136) McCaig, L. and Friedman, CR.(2006) Trends in antimicrobial prescribing in ambulatory care settings in the United States, 1993–2004. Annual Conference on Antimicrobial Resistance.Bethesda, MD: National Foundation for Infectious Diseases.

137) Gould, CV.; Rothenberg, R. and Steinberg, JP.(2006) Antibiotic resistance in long-term acute care hospitals: the perfect storm. Infect Control Hosp Epidemiol. ;27(9):920–5.

138) Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for handwashing and hospital environmental control, 1985. MMWR. 1988;36.

139) Shlaes, DM.; Gerding, DN.; John, JF.; Craig, WA.; Bornstein, DL.; Duncan, RA., *et al*.(1997) Society for Health care Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clin Infect Dis.;25(3):584–99.

140) Gold, HS. and Moellering, RC. (1996) Antimicrobial-drug resistance. N Engl J Med. ;335: 1445–53.

141)Gerding, DN. and Larson, TA.(2004) Resistance surveillance programs and the incidence of Gram-negative bacillary resistance Projan S. Phage-inspired antibiotics? Nat Biotechnol 22(2):167–8.

142) Liu, J.; Dehbi, M.; Moeck, G.; Arhin, F.; Bauda, P.; Bergeron, D.; Callejo, M.; Ferretti, V.; Ha, N.; Kwan, T.; McCarty, J.; Srikumar R, Williams D, Wu JJ, Gros P, Pelletier J. and DuBow, M.(2004)

Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. Nat Biotechnol 22(2):185–91.

143) Daniel, TM. and Waksman ,S.A. (2005) the discovery of streptomycin. Int J Tuberc Lung Dis 9(2):120–2.

144) Dale, W. and von Schantz,M. (2002). From Genes to Genomes. John Wiley & Sons.Companion to this book, taking recombinant DNA technology much further and intothe world of eukaryotes.

145) Brown,T.A. (2001). Gene Cloning – An Introduction, 4th edn. Blackwell Science. An excellent introductory book.

146) Primrose,S.B.; Twyman,R. and Old, R. W. (2001). Principles of Gene Manipulation, 6th edn. Blackwell Science. Much heavier going, but mandatory for the more advanced student.

147) Glick, B. R. (2003). Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 3rd edn. American Society for Microbiology.

148) Dale,J.W. and Park ,S.F. (2004) Molecular Genetics of Bacteria 4th Edition. John Wiley & Sons Ltd.

149) Barbosa, M. D.; Lin,S.; Markwalder, J. A.; Mills, J. A.; DeVito,J.A.; Teleha,C.A.; Garlapati,V.; Liu,C.; Thompson,A.; Trainor,G.L.;Kurilla,M.G. and Pompliano,D.L. (2002) . Regulated expression of the *Escherichia coli lepB* gene as a tool for cellular testing of antimicrobial compounds that inhibit signal peptidase I *in vitro*. J.Anti Agents Chemo 46:3549–54.

150) Bardy, S. L.; Ng, S. Y. M. and Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. Microbiol. 149**:**295–304.
151) Barlow, M. and Hall, B. G. (2002). Phylogenetic analysis shows that OXA β-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. J. Mol. Evol. **55**:314–21.

152) Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of Archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and the bacterial megaclassification. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**:7–76.

153) Koch, A. L.(2000). Penicillin binding proteins, β-lactams, and lactamases: Offensives, attacks and defensive counter measures. Crit. Rev. Microbiol. 26:1–35.

154) Koch, A. L. (2000). The bacterial way for safe enlargement and division. App. Env. Micro. 66:3657–63.

155) Koch, A. L. (2001). Bacterial growth and form. 2nd edn, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

156) Koch, A. L. (2002). Why are rod-shaped bacteria rod shaped? Trends Microbiol. 10:452–5.

157) Koch, A. L. (2003). Were Gram-positive rods the first bacteria? Trends Microbiol. 11:166–10.

158) Koch, A. L. (2003). Cell wall-deficient (CWD) bacterial pathogens: could amyotrophic lateral sclerosis (ALS) be due to one? Crit. Rev. Microbiol. 29:215–21.

159) Koch, A. L. and Silver,S.(2005). The first cell. FEMS Microbiol Rev. Advances in Microbiol Physiology. 50:227–259.

160) Li, C.; Motaleb, M., A. ; Sal1, M. ; Goldstein S. F., and Charon, N. W.(2000). Spirochete motility J. Mol. Micro. Biotechnol. **2**:345–54.

161) Li, C.; Bakker, R. G. ; Motaleb, M. A. ; Sartakova, M. L. ; Cabello, F. C. and Charon, N.W. (2004). Asymmetrical flagellar rotation in *Borrelia burgdorferi* nonchemotactic mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:6169–74.

162) van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology 11:25R–36R.

163) Scott, KP.; Melville, CM.; Barbosa, TM. *et al*.(2000). Occurrence of the new tetracycline resistance gene *tet*(W) in bacteria from the human gut. J.Antimicrob Agents Chemother ., 44: 775–7.

164) Scott, KP.; Barbosa, TM.; Forbes, KJ. *et al*.(1997) High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance

element in the ruminal anaerobe Butyrivibrio fibrisolvens. Appl Environ Microbiol ., 63: 3405–11.

165) Morse, SA.; Johnson, SR.; Biddle, JW. *et al*.(1986) High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. J.Antimicrob Agents Chemother., 30: 664–70.

166) Gevers, D.; Danielsen, M.; Huys, G. *et al*.(2003) Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl Environ Microbiol., 69: 1270–5.

167) Perreten ,V.; Schwarz, F.; Cresta, L. *et al*.(1997) Antibiotic resistance spread in food. Nature; 389: 801–2.

168) Barbosa, TM.; Scott, KP.; Flint, HJ.(1999) Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, *tet(W)*, isolated from *Butyrivibrio fibrisolvens*, and the occurrence of *tet(O)* in ruminal bacteria. Environ Microbiol 1999; 1: 53–64.

169) Hoyles, L.; Ingana¨s, E.; Falsen, E. *et al*. (2002) *Bifidobacterium scardovii sp*. nov., from human sources. Int J Syst Evol Microbiol .,52: 995–9.

170) Huys, G.; D'Haene, K.; Swings J. (2002) Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. Lett Appl Microbiol ., 34: 402–6.

171) Masco ,L.; Huys, G.; Gevers, D. *et al*.(2003) Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. Syst Appl Microbiol ., 26: 557–63.

172) Melville ,CM.; Brunel, R.; Flint, H.J. *et al*.(2004). The *Butyrivibrio fibrisolvens tet*(W) gene is carried on the novel conjugative transposon TnB1230, which contains duplicated nitroreductase coding sequences. J Bacteriol. 186: 3656–9.

173) Levy, SB. and Marshall, B.(2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med., 10: S122–29.

174) Howell-Jones, RS.; Wilson, MJ.; Hill, KE. *et al*.(2005) A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. J. Antimicrob. Chemother . 55: 143–9.

175) Finch, RG. (2004) Antibiotic resistance: a view from the prescriber. Nat Rev Microbiol . 2: 989–94.

176) Smith, SV. and Gould, IM.(2004) Optimization of antibiotic dosing schedules in the light of increasing antibiotic resistance. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 2: 227–34.

177) Pong, A. and Bradley, JS.(2004) Clinical challenges of nosocomial infections caused by antibiotic-resistant pathogens in pediatrics. Semin Pediatr Infect Dis 15: 21–9.

178) Bronzwaer, S. ; Lonnroth, A. and Haigh, R.(2004) The European Community strategy against antimicrobial resistance. Euro. Surveill. 9: 1–3.

179) Mutnick, AH.; Rhomberg, PR.; Sader, HS. *et al*. Antimicrobial usage and resistance trend relationships from the MYSTIC Programme in North America (1999–2001). J Antimicrob Chemother 53: 290–6.

180) Jain, R. and Danziger, LH.(2004) Multidrug-resistant *Acinetobacter infections*: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother., 38: 1449–59.

181) Du, B.; Long, Y.; Liu, H. *et al*.(2002) Extended-spectrum ß-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive. Care. Med. 28: 1718–23.

182) Blot, SI.; Vandewoude, KH.; Hoste, EA. *et al*.(2002) Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Arch. Intern. Med. 162: 2229–35.

183) Kopp, BJ.; Nix, DE.; Armstrong, EP.(2004) Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. Ann. Pharmacother . 38: 1377–82.

184) DiazGranados, CA. and Jernigan ,JA.(2005) Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. J. Infect. Dis. 191: 588–95.

185) Overbye, KM. and Barrett, JF.(2005) Antibiotics: where did we go wrong? Drug. Discov. Today . 10: 45–52.

186) Cosgrove, SE. and Carmeli ,Y.(2003) The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. Clin. Infect. Dis ., 36: 1433–7.

187) Watters, K.; O'Dwyer, TP. and Rowley, H. (2004) Cost and morbidity of MRSA in head and neck cancer patients: what are the consequences? J. Laryngol. Otol . 118: 694–9.

188) Niederman, MS.(2001) Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. Crit Care Med ., 29: N114–N120.

189) Engemann ,JJ.; Carmeli, Y., Cosgrove, SE. *et al*. (2003) Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin Infect Dis; 36: 592–8.

190) Toubes, E.; Singh, K.; Yin, D. *et al*.(2003) Risk factors for antibiotic-resistant infection and treatment outcomes among hospitalized patients transferred from long-term care facilities: does antimicrobial choice make a difference? Clin Infect Dis .,36: 724–30.

191) Kollef, MH.(2005)Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. Clin. Infect. Dis., 40 Suppl 2: S85–8.

192)Harbarth, S.; Garbino, J.; Pugin, J. *et al*.(2003) Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am. J. Med .115: 529–35.

193) Lodise, TP.; McKinnon, PS.; Swiderski, L. *et al*.(2003) Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin. Infect. Dis . 36: 1418–23.

194)Masterton, R.,; Drusano, G.; Paterson ,DL. *et al*.(2003) Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections—the clinical challenges. J. Hosp. Infect . 55 Suppl 1: 1–12.

195) Osmon, S.; Ward, S.; Fraser, VJ. *et al*.(2004) Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. Chest . 125: 607–16.

196) Poole, K.(2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. 92 Suppl 1: 55S–64S.

197) Wright, GD.(2003) Mechanisms of resistance to antibiotics. Curr. Opin. Chem. Biol . 7: 563–9.

198) McDermott, PF.; Walker, RD. and White, DG.(2003) Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. Int J Toxicol 22: 135–43.

199) Chang, G.(2003) Multidrug resistance ABC transporters. FEBS Lett 555: 102–5.

200) Lage, H.(2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. Int. J. Antimicrob. Agents. 22: 188–99.

201) Mazurkiewicz, P.; Driessen, AJ. and Konings, WN.(2005) What do proton motive force driven multidrug resistance transporters have in common? Curr. Issues. Mol. Biol. 7: 7–11.

202) Doublet, B.; Butaye, P.; Imberechts, H. *et al*.(2004) *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002. Antimicrob. Agents. Chemother. 48: 2510–7.

203) Doublet, B.; Weill, FX.; Fabre, L. *et al*.(2004) Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 48: 3806–12.

204) Bischoff, KM.; White, DG.; Hume, ME. *et al*.(2005) The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett . 243: 285–91.

205) Gebreyes, WA. And Thakur, S.(2005)Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. Antimicrob . Agents. Chemother . 49: 503–11.

206) Bischoff, KM.; White, DG.; McDermott ,PF. *et al*.(2002) Characterization of chloramphenicol resistance in ß-hemolytic

Escherichia coli associated with diarrhea in neonatal swine. J. Clin. Microbiol.40: 389–94.

207) Boyd, D.; Cloeckaert, A.; Chaslus-Dancla, E. *et al*.(2002) Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob. Agents. Chemother. 46: 1714–22.

208) Doublet, B.; Carattoli, A.; Whichard, JM. *et al*. (2004) Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and $bla_{\text{CMY-2}}$ genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS. Microbiol. Lett* . 233: 301–5.

209) Randall, LP.; Cooles, SW.; Osborn, MK. *et al*.(2004) Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J. Antimicrob. Chemother. 53: 208–16.

210) Iwanaga, M.; Toma, C.; Miyazato, T. *et al*.(2004) Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. Antimicrob. Agents. Chemother . 48: 2364–9.

211) White, DG.; Hudson, C.; Maurer, JJ. *et al*.(2000) Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. J. Clin. Microbiol .38: 4593–8.

212) Du, X.;Xia, C.; Shen, J. *et al*. (2004) Characterization of florfenicol resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett. . 236: 183–9.

213) Sanchez, S.; McCrackin Stevenson, MA.; Hudson; CR. *et al*.(2002) Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. J. Clin. Microbiol. 40: 3586–95.

214) Keyes ,K.; Hudson, C.; Maurer, JJ. *et al*.(2000) Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. Antimicrob Agents Chemother 44: 421–4.

215) Singer, RS.;Patterson, SK.; Meier, AE. *et al*.(2004) Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 4047–9.

216) Cabrera, R.; Ruiz, J.; Marco, F. *et al*.(2004) Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3934–9.

217) Kehrenberg, C. and Schwarz, S.(2004) *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. Antimicrob. Agents Chemother . 48: 615–8.

218) Kehrenberg, C. and Schwarz S.(2005) Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn*558*. Antimicrob Agents Chemother 49: 813–5.

219) George, AM. And Hall, RM.(2002) Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein. FEMS Microbiol Lett 209: 209–13.

220) Desomer, J.; Vereecke, D.; Crespi, M. *et al*.(1992) The plasmid-encoded chloramphenicol-resistance protein of *Rhodococcus fascians* is homologous to the transmembrane tetracycline efflux proteins. Mol. Microbiol . 6: 2377–85.

221) Poole, K.(2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect. 10: 12–26.

222) Baucheron, S.; Tyler, S.; Boyd, D. *et al*.(2004) AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. Antimicrob Agents Chemother ., 48: 3729–35.

223) Hasdemir, UO.; Chevalier, J.; Nordmann, P. *et al*.(2004) Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J. Clin. Microbiol. 42: 2701–6.

224) Chau, SL.; Chu, YW. and Houang, ET.(2004) Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. Antimicrob Agents Chemother ., 48: 4054–5.

225) Jalal, S.; Wretlind, G.; Gotoh, N. *et al*.(1999) Rapid identification of mutations in a multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. APMIS ., 107: 1109–16.

226) Kohler, T.; Van Delden, C.; Curty, LK. *et al*.(2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol ., 183: 5213–22.

227) Sobel ,ML.; Poole, K. and Neshat, S.(2005) Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 187: 1246–53.

228) Rajyaguru, JM. and Muszynski, MJ.(1997) Association of resistance to trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol and quinolones with changes in major outer membrane proteins and lipopolysaccharide in *Burkholderia cepacia*. J. Antimicrob. Chemother., 40: 803–9.

229) Nair, BM.; Cheung, K.; Griffith, A. *et al*.(2004) Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (*B. cenocepacia*). J. Clin. Invest. 113: 464–73.

230) Burns, JL.; Wadsworth, CD.; Barry, JJ. *et al*.(1996) Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 40: 307–13.

231) Hansen, LH.; Johannesen, E.; Burmolle, M. *et al*.(2004) Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3332–7.

232) Poelarends, G.; Mazurkiewicz, P. and Konings W.(2002) Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. Biochim Biophys Acta.,1555: 1.

233) Olliver, A.; Valle, M.; Chaslus-Dancla, E. *et al*.(2005) Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS*1* or IS*10* elements in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 49: 289–301.

234) Roberts, MC.(2003) Tetracycline therapy: update. Clin. Infect. Dis. 36: 462–7.

235) Bartlett, JG.(2004) Pocket Book of Infectious Disease Therapy, 12 edn. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

236) Roberts, MC.(2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett., 245: 195–203.

237) Maynard, C.; Bekal, S. Sanschagrin, F. *et al*.(2004) Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of

extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol ., 42: 5444–52

238) Duarte, RS.; Bellei, BC.; Miranda, OP. *et al*.(2005) Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. Antimicrob Agents Chemother., 49: 97–103.

239) Nielsen, HU.; Hammerum, AM.; Ekelund, K. *et al*.(2004) Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes:* co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? Microb. Drug Resist. 10: 231–8.

240) Tian, Y.; Aarestrup, FM. and Lu, CP.(2004) Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. Vet. Microbiol. 103: 55–62.

241) Brenciani, A.; Ojo, KK.; Monachetti, A. *et al*.(2004) Distribution and molecular analysis of *mef*(A)-containing elements in tetracycline-susceptible and -resistant *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with efflux-mediated erythromycin resistance. J. Antimicrob. Chemother., 54: 991–8.

242) Matsumoto, M.; Sakae, K.; Ohta, M. *et al*.(2005) Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A streptococcal isolates, T serotypes 4 and 11. Int J Antimicrob Agents 25: 142–7.

243) Rodriguez-Avial, I.; Rodriguez-Avial, C.; Culebras, E. *et al*.(2003) Distribution of tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* and *tet(K)* in blood isolates of viridans group streptococci harbouring *erm(B)* and *mef*(A) genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid. Int J Antimicrob Agents 21: 536–41.

244) Petersen, A. and Dalsgaard, A.(2003) Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp, isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. Environ. Microbiol. 5: 395–402.

245) Huys, G.; D'Haene, K.; Collard, JM. *et al*.(2004) Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1555–62.

246) Ng, LK.; Martin, I.; Alfa, M. *et al*.(2001) Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol Cell Probes 2001; 15: 209–15.

247) Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Werner, G. *et al*. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 41: 4089–94.

248) Sekiguchi ,J.; Fujino, T.; Saruta, K. *et al*.(2004) Prevalence of erythromycin-, tetracycline-, and aminoglycoside-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. Jpn. J. Infect. Dis., 57: 74–7.

249) Aarestrup, FM. and Jensen, LB.(2002) Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. Vet. Microbiol., 89: 83–94.

250)Aarestrup, FM.; Agers, LY.; Ahrens, P. *et al*.(2000) Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. Vet. Microbiol . 74: 353–64.

251) Wilcks, A.; Andersen, SR. and Licht, TR.(2005) Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. FEMS Microbiol Lett ., 243: 15–9.

252) Aarestrup, FM.; Lertworapreecha, M.; Evans, MC. *et al*.(2003) Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. J. Antimicrob. Chemother., 52: 715–8.

253) Furushita, M.; Shiba, T.; Maeda, T. *et al*.(2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. Appl Environ Microbiol., 69: 5336–42.

254) Cousin, S.; Roberts, MC. and Whittington, WL.(2004) Insertion of a thymine (+T) in the 13 base pair inverted repeat of the *Neisseria gonorrhoeae mtr* promoter region and antibiotic susceptibility. Int J Antimicrob Agents ., 23: 418–9.

255) De Rossi, E.; Arrigo, P.; Bellinzoni, M. *et al*.(2002) The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Med. 8: 714–24.

256) Ainsa, JA.; Blokpoel, MC.; Otal, I. *et al*.(1998) Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol ., 180: 5836–43.

257) Silva, PE.; Bigi, F.; de La Paz, SM. *et al*. (2001) Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother* ., 45: 800–4.

258) Hamzehpour, MM.; Pechere, J.C.; Plesiat, P. *et al*.(1995) OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicro.b Agents Chemother. 39: 2392–6.

259) Alonso, A.; Campanario, E. and Martinez, JL.(1999) Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology , 145: 2857–62.

260) Alonso ,A. and Martinez, JL.(2000) Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 3079–86.

261) Alonso, A. and Martinez JL.(1997) Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1140–2.

262) Zhang, L.; Li, X.Z. and Poole, K.(2000) Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. Antimicrob Agents Chemother., 44: 287–93.

263) Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S. *et al*.(2000) Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 44: 2242–6.

263) Goldman, RC. and Scaglione, F.(2004) The macrolide–bacterium interaction and its biological basis. Curr Drug Targets Infect. Disord. 4: 241–60.

264) Zhanel, GG.; Dueck, M.; Hoban, DJ. *et al*.(2001) Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. Drugs , 61: 443–98.

265) Leclercq, R.(2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis., 34: 482–92.

266) Zuckerman, JM.(2004) Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. Infect. Dis. Clin. North Am., 18: 621–49.

267) Spizek, J. and Rezanka, T.(2004) Lincomycin, clindamycin and their applications. Appl Microbiol Biotechnol., 64: 455–64.

268) Blondeau, JM.(2002) Sanche SE. Quinupristin/dalfopristin. Expert Opin Pharmacother., 3: 1341–64.

269) Bermudez, LE. and Yamazaki, Y.(2004) Effects of macrolides and ketolides on mycobacterial infections. Curr. Pharm. Des., 10: 3221–8.

270) Roberts, MC.(2004) Distribution of macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide and oxazolidinone (MLSKO) resistance genes in Gram-negative bacteria. Curr Drug Targets Infect Disord ., 4: 207–15.

271) Pozzi, G.; Iannelli, F.; Oggioni, MR. *et al*. (2004) Genetic elements carrying macrolide efflux genes in streptococci. Curr Drug Targets Infect Disord., 4: 203–6.

272) Roberts, MC.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P. *et al*.(2003) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 43: 2823–30.

273) Klaassen, CH. and Mouton, JW.(2005) Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between mef(A) and mef(E). Antimicrob. Agents Chemother. 49: 1271–8.

274) Giovanetti, E.; Brenciani, A.; Vecchi, M. *et al*.(2005) Prophage association of *mefA* elements encoding efflux-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. J. Antimicrob. Chemother. 55: 445–51.

275) Daly, MM.; Doktor, S.; Flamm, R. *et al*.(2004) Characterization and prevalence of MefA, MefE, and the associated *msr*(D) gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 42: 3570–4.

276) Montanari, MP.; Tili, E.; Cochetti, I. *et al*. (2004) Molecular characterization of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones emerging in Italy. Microb. Drug. Resist. 10: 209–17.

277) Hotomi, M.; Yamanaka, N.; Billal, DS. *et al*. (2004) Genotyping of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from paired middle ear fluid and nasopharynx by pulsed-field gel electrophoresis. ORL J. Otorhinolaryngol Relat. Spec. 66: 233–40.

278) Hsueh, PR.; Teng, LJ.; Lee, LN. *et al*.(2002) Increased prevalence of erythromycin resistance in streptococci: substantial upsurge in erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pyogenes* (1979–1998) but not in *Streptococcus pneumoniae* (1985–1999) in Taiwan. Microb. Drug. Resist ., 8: 27–33.

279) Farrell, DJ.; Morrissey, I.; Bakker, S. *et al*.(2004) Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm*(*B*)- and *mef*(A)-mediated macrolide resistance. J. Clin. Microbiol., 42: 764–8.

280) Brown, SD.; Farrell, DJ. and Morrissey, I.(2004) Prevalence and molecular analysis of macrolide and fluoroquinolone resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected during the 2000–2001 PROTEKT US Study. J. Clin. Microbiol ., 42: 4980–7.

281) Jacobs, MR. and Johnson, CE.(2003) Macrolide resistance: an increasing concern for treatment failure in children. Pediatr. Infect. Dis. J ., 22: S131–8.

282) Fotopoulou, N.; Tassios, PT.; Beste, DV. *et al*.(2003) A common clone of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece and the UK. Clin. Microbiol. Infect., 9: 924–9.

283) Monaco, M.; Camilli, R.; D'Ambrosio, F. *et al*.(2005) Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J. Antimicrob Chemother ., 55: 256–9.

284) Wierzbowski, AK.; Swedlo, D.; Boyd, D. *et al*.(2005) Molecular epidemiology and prevalence of macrolide efflux genes *mefA* and *mefE* in *Streptococcus pneumoniae* obtained in Canada from 1997 to 2002. Antimicrob Agents Chemother., 49: 1257–61.

285) Bonofiglio, L.; Ojeda, MI.; de Mier, C. *et al*.(2005) Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital. Int. J. Antimicrob Agents, 25: 260–3.

286) Hotomi, M.; Billal, DS.; Shimada, J. *et al*.(2005) Increase of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* expressing *mefE* or *ermB* gene in the nasopharynx among children with otitis media. Laryngoscope ., 115: 317–20.

287) Beekmann, SE.; Heilmann, KP.; Richter, SS. *et al*.(2005) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and group A beta-haemolytic streptococci in 2002–2003. Results of the multinational GRASP Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents , 25: 148–56.

288) Ardanuy, C.; Tubau, F.; Linares, J. *et al*.(2005) Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother . 49: 827–9.

289) Desjardins, M.; Delgaty, KL.; Ramotar, K. *et al*.(2004) Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group A and group B streptococcus: implications for reporting susceptibility results. J. Clin. Microbiol. 42: 5620–3.

290) Ko, WC.; Yan, JJ.; Lee, NY. *et al*.(2004) Polyclonal spread of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in southern Taiwan. Microb. Drug Resist. 10: 306–12.

291)Cerda Zolezzi, P.; Laplana, LM.; Calvo, CR. *et al*.(2004) Molecular basis of resistance to macrolides and other antibiotics in commensal viridans group streptococci and *Gemella* spp. and transfer of resistance genes to *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother., 48: 3462–7.

292) Bozdogan, B. and Appelbaum, PC.(2004) Macrolide resistance in streptococci and *Haemophilus influenzae*. Clin. Lab. Med., 24: 455–75.

293) Edelstein, PH. (2004) Pneumococcal resistance to macrolides, lincosamides, ketolides, and streptogramin B agents: molecular mechanisms and resistance phenotypes. Clin. Infect. Dis ., 38 Suppl 4: S322–7.

294) Cousin ,SL.; Whittington, WL. and Roberts, MC.(2003) Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Antimicrob Chemother ., 51: 131–3.

295) Wang, Y.; Wang, GR.; Shelby, A. *et al*.(2003) A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnGERM1, contains genes also found in gram-positive bacteria. Appl. Environ Microbiol ., 69: 4595–603.

296) Ojo, KK.; Ulep, C.; Van Kirk, N. *et al*.(2004) The *mef*(A) gene predominates among seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 3451–6.

297) Cousin, S.; Whittington, WL. and Roberts MC.(2003) Acquired macrolide resistance genes in pathogenic *Neisseria* spp. isolated between 1940 and 1987. Antimicrob Agents Chemother., 47: 3877–80.

298) Lebel, S.; Bouttier, S. and Lambert, T.(2004) The *cme* gene of *Clostridium difficile* confers multidrug resistance in *Enterococcus faecalis*. FEMS Microbiol Lett. 238: 93–100.

299) Reynolds, E.; Ross, JI. and Cove, JH.(2003) Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? Int. J. Antimicrob Agents , 22: 228–36.

300) Lina, G.; Quaglia, A.; Reverdy, ME. *et al*.(1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother., 43: 1062–6.

301) Schmitz, FJ.; Sadurski, R.; Kray, A. *et al*.(2000) Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. J. Antimicrob. Chemother., 45: 891–4.

302) Haroche, J.; Morvan, A.; Davi, M. *et al*.(2003) Clonal diversity among streptogramin A-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in French hospitals. J. Clin. Microbiol., 41: 586–91.

303) Haroche, J.; Allignet, J.; Buchrieser, C. *et al*. (2000) Characterization of a variant of *vga*(A) conferring resistance to streptogramin A and related compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2271–5.

304) Allignet, J. and El Solh, N.(1997) Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter

conferring resistance to streptogramin A and related compounds. Gene 202: 133–8.

305) Dupont, P.; Hocquet, D.; Jeannot, K. *et al*.(2005) Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother., 55: 518–22.

306) Kriengkauykiat, J.; Porter, E.; Lomovskaya, O. *et al*.(2005) Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother., 49: 565–70.

307) Giraud, E.; Blanc, G.; Bouju-Albert, A. *et al*.(2004) Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis. J. Med. Microbiol. 53: 895–901.

308) Pumbwe, L.; Randall, LP.; Woodward, MJ. *et al*.(2004) Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. J. Antimicrob. Chemother., 54: 341–7.

309) Zhang, Q.; Lin, J. and Pereira, S.(2003) Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. Anim Health Res Rev 2003; 4: 63–71.

310) Linde, HJ.; Notka, F.; Irtenkauf, C. *et al*.(2002) Increase in MICs of ciprofloxacin *in vivo* in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Chemother., 49: 625–30.

311) Mazzariol, A.; Tokue, Y.; Kanegawa, TM. *et al*. (2000) High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob. Agents Chemother., 44: 3441–3.

312) Wang, H.; Dzink-Fox, JL.; Chen, M. *et al*.(2001) Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 1515–21.

313) Gruteke, P.; Goessens, W.; Van Gils, J. *et al*.(2003) Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum ß-lactamase

SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. J. Clin. Microbiol., 41: 1161–6.

314) Wagenlehner, FM.; Heisig, P.; Irtenkauf, C. *et al*.(2003) Clinically significant borderline resistance of sequential clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. Antimicrob Agents , 22: 367–73.

315) Mazzariol, A.; Zuliani, J.; Cornaglia, G. *et al*.(2002) AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. Antimicrob Agents Chemother., 46: 3984–6.

316) del Mar, TM.; Vila, J.; Ruiz, J. *et al*.(2000) Decreased permeability and enhanced proton-dependent active efflux in the development of resistance to quinolones in *Morganella morganii*. Int. J. Antimicrob Agents , 14: 157–60.

317) Oh, H.; Stenhoff, J.; Jalal, S. *et al*. (2003) Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Microb. Drug Resist . 9: 323–8.

318) Veal, WL.; Nicholas, RA. and Shafer, WM.(2002) Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 184: 5619–24.

319) Kaczmarek, FS.; Gootz, TD.; Dib-Hajj, F. *et al*. (2004) Genetic and molecular characterization of ß-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 1630–9.

320) Kallman, O.; Fendukly, F.; Karlsson, I. *et al*.(2003) Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. Scand J. Infect. Dis. 35: 464–70.

321) Fujisaki, S.; Ohnuma, S.; Horiuchi, T. *et al*.(1996) Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. Gene 175: 83–7.

322) Turnidge, J. and Collignon, P. (1999) Resistance to fusidic acid. Int J. Antimicrob. Agents , 12 Suppl 2: S35–S44.

323) Ramos, JL.; Duque, E.; Gallegos, MT. *et al*.(2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 56: 743–68.

333) Fernandes, P.; Ferreira, BS. and Cabral, JM. (2003) Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. Int. J. Antimicrob Agents , 22: 211–6.

334) Randall, LP.; Cooles, SW.; Sayers, AR. *et al*.(2001) Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes. J. Med. Microbiol., 50: 919–24.

335) Zhao, S.; Maurer, JJ.; Hubert, S. *et al*.(2005) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet. Microbiol., 107: 215–24.

336) Jude, F.; Arpin, C.; Brachet-Castang, C. *et al*.(2004) TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. FEMS Microbiol Lett., 232: 7–14.

337) Nies, DH.(2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev., 27: 313–39.

338) Poole, K.(2004) Acquired resistance. In Fraise AP, Lambert PA, Maillard J-Y, eds. Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization. Oxford: Blackwell Publishing, 170–83.

339) Leelaporn, A.; Paulsen, IT.; Tennent, JM. *et al*.(1994) Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J. Med. Microbiol., 40: 214–20.

340) Noguchi, N.; Hase, M.; Kitta, M. *et al*.(1999) Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett ., 172: 247–53.

341) Kazama, H.; Hamashima, H.; Sasatsu, M. *et al*.(1998) Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett ., 165: 295–9.

342) Bjorland, J.; Steinum, T.; Sunde, M. *et al*.(2003) Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium

compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. Antimicrob. Agents Chemother., 47: 3046–52.

343) Bjorland, J.; Sunde, M. and Waage, S.(2001) Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol ., 39: 3999–4004.

344) Heir, E.; Sundheim, G. and Holck, AL.(1999) Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. Int. J. Food Microbiol., 48: 211–9.

345) Sidhu, MS.; Heir, E.; Sorum, H. *et al*.(2001) Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and ß-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. Microb. Drug Resist., 7: 363–71.

346) Heir, E.; Sundheim, G. and Holck, AL.(1995) Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. J. Appl. Bacteriol., 79: 149–56.

347)Noguchi, N.; Tamura, M.; Narui, K. *et al*.(2002) Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. Biol. Pharm. Bull., 25: 1129–32.

348) Noguchi, N.; Okada, H.; Narui, K. *et al*.(2004) Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug Resist. 10: 197–203.

349) Kaatz, GW.; McAleese, F. and Seo, SM.(2005) Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. Antimicrob. Agents Chemother ., 49: 1857–64.

350) Lee, EW.; Huda, MN.; Kuroda, T. *et al*.(2003) EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother., 47: 3733–8.

351) Kaatz, GW.; Seo, SM.; O'Brien, L. *et al*.(2000) Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother., 44: 1404–6.

352) Aase, B.; Sundheim, G.; Langsrud, S. *et al*.(2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 62: 57–63.

353) Barbolla, R.; Catalano, M.; Orman, BE. *et al*. (2004) Class 1 integrons increase trimethoprim–sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrob Agents Chemother., 48: 666–9.

354) Saenz, Y.; Brinas, L.; Dominguez, E. *et al*.(2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother., 48: 3996–4001.

355) O'Halloran, F.; Lucey, B.; Cryan, B. *et al*.(2004) Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter* spp. J. Antimicrob Chemother., 53: 952–7.

356) Kucken, D.; Feucht, H. and Kaulfers, P.(2000) Association of *qacE* and *qacE*Δ*1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett., 183: 95–8.

357) Langsrud, S.; Sundheim, G. and Holck, AL.(2005) Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. J. Appl. Microbiol., 96: 201–8.

358) Braoudaki, M. and Hilton, AC.(2004) Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. J. Clin. Microbiol ., 42: 73–8.

359) Braoudaki, M. and Hilton AC.(2005) Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. Int. J. Antimicrob Agents , 25: 31–7.

360) Kampf, G. and Kramer, A.(2004) Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. Clin Microbiol Rev., 17: 863–93.

361) Braoudaki, M, and Hilton, AC.(2004) Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. FEMS Microbiol Lett ., 235: 305–9.

362) Sanchez, P.; Moreno, E. and Martinez, JL.(2005) The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. Antimicrob Agents Chemother., 49: 781–2.

363) Pumbwe, L.; Randall, LP.; Woodward, MJ. *et al*.(2005) Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. Antimicrob Agents Chemother., 49: 1289–93.

364) Randall, LP.; Cooles, SW.; Piddock, LJ. *et al*.(2004) Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. J. Antimicrob Chemother., 54: 621–7.

365) Randall, LP. and Ridley, AM. (2003)Cooles SW *et al*. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. J. Antimicrob Chemother., 52: 507–10.

366) Betts, JC. ; McLaren, A.; Lennon, MG. *et al*.(2003) Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother ., 47: 2903–13.

367) Gilmour, MW.; Thomson, NR.; Sanders, M. *et al*.(2004) The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. Plasmid, 52: 182–202.

368) Chen, YT.; Chang, HY.; Lai, YC. *et al*.(2004) Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. Gene, 337: 189–98.

369) Gilbert, P. and McBain, AJ.(2003) Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol Rev., 16: 189–208.

370) Tikhonova, EB. and Zgurskaya, HI.(2004) AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. J. Biol. Chem., 279: 32116–24.

371) Nehme, D.; Li, XZ.; Elliot, R. *et al*.(2004) Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in *mexA* compromising MexA multimerization and interaction with MexB. J. Bacteriol., 186: 2973–83.

372) Mokhonov, VV.; Mokhonova, EI.; Akama, H. *et al*.(2004) Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Biophys Res Commun., 322: 483–9.

373) Adler, J. and Bibi, E.(2004) Determinants of substrate recognition by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA identified on both sides of the membrane. J. Biol. Chem., 279: 8957–65.

374) Adler, J.; Lewinson, O. and Bibi, E.(2004) Role of a conserved membrane-embedded acidic residue in the multidrug transporter MdfA. Biochemistry ,43: 518–25.

375) Adler, J. and Bibi, E.(2005) Promiscuity in the geometry of electrostatic interactions between the *Escherichia coli* multidrug resistance transporter MdfA and cationic substrates. J. Biol. Chem., 280: 2721–9.

376) McKeegan, KS.; Borges-Walmsley, MI. and Walmsley, AR.(2004) Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. Curr Opin Pharmacol., 4: 479–86.

377) Price, LB.; Vogler, A.; Pearson, T. *et al*.(2003) *In vitro* selection and characterization of *Bacillus anthracis* mutants with high-level resistance to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother ., 47: 2362–5.

378) Pradel, E. and Pages, JM. (2002) The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob Agents Chemother., 46: 2640–3.

379) Schneiders, T.; Amyes, SG. and Levy, SB.(2003) Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. Antimicrob Agents Chemother., 47: 2831–7.

380) Baucheron, S.; Imberechts, H.; Chaslus-Dancla, E. *et al*.(2002) The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT204. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 281–9.

381) Luo, N.; Sahin, O.; Lin, J. *et al*.(2003) *In vivo* selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. Antimicrob Agents Chemother., 47: 390–4.

382) Kumar, A. and Worobec, EA.(2005) Cloning sequencing and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother., 49: 1495–1501.

383) Oh, H., and Edlund, C.(2003) Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect., 9: 512–7.

384) Burse, A.; Weingart, H. and Ullrich, MS.(2004) NorM,n *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. Appl. Environ Microbiol., 70: 693–703.

385) Rouquette-Loughlin, C.; Dunham, SA.; Kuhn, M. *et al*.(2003) The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. J. Bacteriol ., 185: 1101–6.

386) Xu XJ, Su XZ, Morita Y *et al*.(2003) Molecular cloning and characterization of the HmrM multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd. Microbiol Immunol ., 47: 937–43.

387) He, GX.; Kuroda, T.; Mima, T. *et al*.(2004) An H^+-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 186: 262–5.

388) Barlow, RS.; Pemberton, JM.; Desmarchelier, PM. *et al*.(2004) Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. Antimicrob Agents Chemother., 48: 838–42.

389)Granier, S. A.; Plaisance,L. ; Leflon-Guibout,V. ; Lagier,E.; Morand,S. ;Goldstein,F. and Nicolas-Chanoine,M.H.(2003). Recognition of two genetic groups in *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of the chromosomal ß-lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:661-668

390) Naas, T.;Aubert, D.;Ozcan, A. and Nordmann, P. (2007). Chromosome-Encoded Narrow-Spectrum Ambler Class A {beta}-Lactamase GIL-1 from Citrobacter gillenii. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1365-1372 .

391) Jacoby, G. A. (2006). {beta}-Lactamase Nomenclature.. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1123-1129.

392) Gillis, R. J.; White, K.-H.; Choi, K.-H.; Wagner, V. E.; Schweizer, H. P. and Iglewski, B. H. (2005). Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3858-3867.

393)Koronakis, V.; Eswaran,E and Hughes.C.(2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. Annu. Rev. Biochem. 73:467-489.

394)Waite, R. D.; Papakonstantinopoulou, A.; Littler,E. and Curtis, M.A.(2005).Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. J. Bacteriol. 187:6571-6576.

395)Westover, B. P.; Buhler, J. D. , Sonnenburg, J. L. and Gordon, J. I. (2005). Operon prediction without a training set. Bioinformatics 21:880-888.

396)Kvist, M.; Hancock, V. and Klemm, P. (2008). Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl. Environ.* Microbiol. 74: 7376-7382 .

397) الخفاجي، زهرة محمود(2008) التقنية الحيوية الميكروبية .الطبعة الأولى . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

بعض المواقع الألكترونية المفيدة:

1)Alliance for the Prudent Use of Antibiotics
http://www.tufts.edu/med/apua/

2)Animal Health Institute
http://www.ahi.org/

3)Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

http://www.cdc.gov/

4)National Institutes of Health (NIH)
http://www.nih.gov/

5)U.S. Food and Drug Administration (FDA)
http://www.fda.gov/

الفهارس

Actinomycetes, 13
Actinomycin-D , 117
Acyclovir ,113
acylamino Penicillins , 17
Acylases,16
Adenine ,40

Agrobacterium tumifaciens, 43,69
Agropine Plasmid,69
Acetyl transferases , 136
Acinetobacter , 16,136
Acne , 32
Acr EF-TolC , 142
AcrAB-TolC, 142
Acremonium, 13
Acremonium cephalosporium, 18

Benzoate, 70
benzyl Penicillin, 15,132
Berberis , 142
Bidirectional replication, 147
Biodegredation, 70
Bioremediation ,70
bla ctx-M, 134,161
bla, 77
blaR1, 131
blaR2 , 131
Bleomycin ,117

Borrelia , 29 , 43,63

Borrelidin, 118
Broad spectrum antibiotic,12

Brucella , 24
Burkholderia pseudomallia , 142
Bush-Jacoby-Medeiros , 129
Campylobacter jejuni ,10 , 121 ,142
Cap Structure,59
Capremycin ,29
Carbacephems,14,22
Carbapenemases, 130

Carbapenems, 14,23,105
Carbencillin ,17,26
Carrier molecules , 101
Caspofungin, 107
Catechol , 70
Cationic peptide , 109
Cefamandole , 19
Cefepime ,19
Cefotaxime,19
Cefpirome ,19
Cefquinome , 20
Ceftazidime , 19
Ceftobiprole , 20
Ceftriaxone , 19
Cefuroxime ,19
Cell membrane ,108
alanine racemase, 102

Alexander Fleming,14
Allylamines,111

Ambler,129,130
Amikacin ,26,27,124,135,139
Aminoacyl site,64
Aminoacylation,62,120

6-aminopenicillinic acid,15,16
3-amino mono bactamic acid,22
ampC,100
ampR, 131
AmrAB-OprA, 142
Anti Staphylococcal penicillin, 16
Antifolate, 34
Antigenic Variation , 87

Arabinogalactan, 106
arabinosyl transferase,106
Archae, 93
A-Site , 64
ATP-biniding cassette,141
Augmentin, 21
Autolysins , 94
Azithromycin,29,30,35
Azlocillin, 17
Aztreoname,22,105
Bacillus,13, 134,165
B.brevis,13
B.polymyxa ,13
B.subtilis ,13,85

Bacitracin,29,101
Back mutation, 153
Bacterim, 34
Bacteriocidal , 12,119
Bacteriophages, 11,87
Bacteriostatic, 12,119
Bacteroides fragilis, 22
Benthamine ,15
Benzathine,15

Conjugative Transposons,84,163

Consensus Sequences,54
cop B, 72
copA,72
Core enzyme ,52,55
Core polysaccharide,96
Co-trimoxazole ,34,168
Coumarins,116
Cross-resistance ,28
Cryptococcus neoformans,12,113
CTn,84,163

CTX-M,134,161
Cycloserine ,35,102
Cyclothialidine ,116
Cystic fibrosis ,36
Cytomegalo virus ,113
Cytosine,40
D-2-deoxy ribose,39
Dalacin,32
D-alanine,98,99
D-alanine - D-alanine,98
Dalbovancin,30
Dapsone,35
Daptomycin,110
Dehydropeptidase,23,105
Demethyl Chlortetracycline,24
Diamino pyrimidine,34
Dicloxacillin,16
Dihydrofolate Reductase,34,112,140
Dihydropteroic Synthetase,112,143
Dihydrothiazine,18
Dihydrouridine,63
Dimethyl sulfoxide,86

direct repeat,77,79
Dirithromycin,29
Dna A,51
DNA Gyrase,49,74,114,115
DNA integrase,78
DNA Ligase,49,156
DNA Polymerase,46,47
DNA polymerase α, 50

Cephacetrile ,18
Cephallosporonic acid ,129
Cephalordine ,18,19
Cephalosporin C , 18
Cephalosporin N ,18
Cephalosporin P ,18
Cephalosporins, 18
Cephalosporium acremonium ,18
Cephalothin, 18
Cephalxin,18

Cephaprine,18,19
Cephazolin,18
Chloramphenicol, 31,121
3-Chlorobenzoate ,70'
Chlorotetracycline ,24
Chromobacterium violaceum, 22
Cilastatin ,23,105
Ciprofloxacin ,35,36,114
cis mobilization,167
Citrobacter freundi,131,157
Clarithromycin ,29,35
Clavam oxazolidine ,20
Clavams,14,20
Clavulanic acid ,20,21,22
Clindamycin,32,121
Clofazimine ,95
Clomocycline ,24
Clostridium difficile,30,121
Clostridium tetani, 69
Clotrimazole,38
Cloxacillin,16,132
Coccidiosis,110
Coding Strand,52,116
Col E1,71,72,74,82
Colicinogenic Plasmid,68
Colistin,29
Colonization,32
Complementation,154
Conditional Mutants,153
Conduction ,82
conjugative plasmid,82

excision repair,156
Exons,58
Extended-spectrum penicillins,17
Faropenem,23,105
Fertility Plasmid,68
Fluoro quinolones,36
F-methionin,63
Folic acid,111,143
Forward mutation,153
Fosfomycin,102,128
Frameshift mutation,157
Framycetin,26,27
Furanomycin,118
Furazolidine,36
Fusidic acid,13,31,123
Ganciclovir,113
Gemifloxacin,36,114
gene cassettes,78,163

Gene expression,52
Generalized transduction,88
Gentamycin,26
Gluconobacter,13

Glycopeptides,29
Lipoglycopeptides,29,30,
103

Glycylcycline,25
Gramicidin A,109
Gramicidins,109
Gray baby syndrome,31,120
grI A,115
grI B,115
Guanine,40
gyr A,115,138
gyr B,115
Haemophilus influenzae,17,19,22,28,37,76
Helicase,47,48
Hfr,81

Histones like proteins,44
Hogness box,54

DNA polymerase ß ,50
DNA polymerase £,50
DNA polymerase ¥ , 50
DNA Polymerase 1 ,49
DNA Polymerase II, 49
DNA polymerase III ,49
Domains,44
Donation,82
Donor Cells ,80

Doripenem ,23
Doxycycline ,24
Drug efflux pump,141
E.coli 17,52, 68,69,78
Echinocandin,107
Econazole,38
Ef-G,64,123
Ef-TS ,64
Ef-TU ,64
Electroporation,86

Elongation,53,61
emb A,106
emb B ,106
emb C ,106
emm,44
Emr B,142
Endonuclease,47,86
Enol,154
Enoxacin,37
Entamoeba histolytica,27
Enterobacter cloacae,131,157
Enterobacteriaceae,83
Enterococcus faecalis,30,32,33 83,145
Episome ,81

Erlich ,120
Ertapenem,23,105
Erythromycin,28
Erythromycin estolate,28
E-Site,64
Ethyl Ethane Sulphate,150
Ethyl Methane Sulphonate ,150

Lincomycin,92
Lincosamides,32,137,138
Lipid A,96
Lipopolysaccharide,95
Listeria monocytogenes23,162
Log phase,85

Lomefloxacin,37
Loracarbef,22
Lysogeny,88

Lysozyme,93,136
Lytic cycle,88

mac AB-TolC,141
Macrocyclic Lacton ring,27,121
Macrophage,29
Macrotetrolides,110
Maganin II, 109
Mebenadazole, 38
Mec R1, 137
Mecillinam,104
Meropenem,23,105
Mesalamine,33
Meselson & Stahl,45
metalloβ-lactamases,130,132
Methacycline,24
Methicillin,16,134
Methoprim,34
Methotrexate,34
Metronidazole,38,144
Mex AB – OprM,142
Mex CD – OprJ,142
Mex EF – OprN,142
Mex XY – OprM, 142
Mezlocillin,17
Micafungin,107
Miconazole,38,111
Micromonospora purpurea,73,144
Minocycline,24,25,128
Miscellaneous Antibiotics,31
Mitomycin – C ,117,150
mobilizable plasmids,72,80

Hok,74
hok mRNA,74
Holliday Junction,90

homologous recombination,76,88
Horizontal genes transfer,159
Hydratis Canadensis,142
Hypersensitivity,23
Idiolites,14
Idiophase,14
ileS2, 32
Imi-1,134
Imidazole,38,111
Imino,154
Iminomethoxy,19
Imipenem,23,105
Impetigo,118,123
Incompatibility,72
Induced mutation,149
inh A,106
Initiation, 53,61,64
Insersion sequences,75
Integrons,78,163
Introns,58
Inverted repeat,35,54,55
Ionizing radiation,150
Ionophoric,110
Iterons,73
Kanamycin,26,27
KDO, 96
Keflex,18
Keto,154
Keto-3-deoxyoctanate,26
Ketoconazole,38,111
Kluyveromyces lactis,124
L.P.S ,48,73
lagging strand,24,52
L-alanine,98
leader segment ,56
Leading strand ,56
Legionella pneumoniae, 22,28
Leprosy ,35
Lex A ,157

Nitroreductase,144
Nmc-A,134
Nocardia,23
Nocardicin A,23
Nonactin,110
non-conjugative plasmid,82

Nonsense mutation,152
Nopaline Plasmid,69
Norfloxacin,36
Nucleoid,44
Nucleoside,40
Nucleoside analogues,113
O-adenyl transferase,135
Ofloxacin,35,36
Okazaki fragments,48
Oleandomycin,28
Olivanic acid,23
Omp C, 132,133
Omp F, 132,133
Operator,131
Opines,69
Ori T, 71,84
Ori V ,71,72
Ori C, 73
Origin of replication,47
Oritavancin,30,103
O-specific side chain,96
Outer membrane,95,109,119
Outer membrane protein F,127,128
Outer membrane proteinC, 127,128
OXA-14,132
OXA-15,132
OXA-16,132
OXA-18,132
Oxacillinases,130
Oxolinic acid,114
Oxytetracycline,24,142
P(4)-aminosalicylic acid,26
P.chrysogenum,15
Palindrome,56
Para-aminobenzoic acid,111,143
Partially diploid,82

Mobilizable Transposons ,164
Moderate-spectrum penicillins,16
Monensin ,110
Monobactam,13,14,105

Monocistronic,59
Morpholines,111
mosaic genes,136,158
Mra Y,98

MRSA,20,103,136,146
Multi drug-resistance *M .tuberculosis,35*
Multidrug efflux pumps,127
Mupirocin,32,118
Muramic acid nucleotide,98
Mutant,148
Mutator genes,154
Mutator Microorganisms,149
Mycobacterium paratuberculosis,76
Mycobacterium smegmatis,127,136
Mycobacterium tuberculosis,25,44
Mycoplasma,43,93,108

Myxococcus,43
N – acetyl glucose amine,98, 100
N – acetyl muramic acid,98,102
N.cinerea,158
N-acetyl transferase,135
Nafcillin,16
Naftifine,116

Nalidixic acid,36,114
Narrow spectrum antibiotics,12

Natural Penicillins,15
Neisseria flavescens,158
Neisseria gonorrhoeae,19,118
Neomycin,26,27,119
Netilmicin,26,27,119
Neurospora crassa,109
Nitrofurans,36
Nitrofurazone,36

Protoplast,93
Pseudomembranous colitis,23,30
Pseudomonas putida,70
Pseudomonas acidophila,13

Pseudomonas aeruginosa,9,16,17,19,22,36,127,131, 142,149,159
Pseudomonas fluorescens,32
Pseudomonic a- A,32,118
Pseudoreversion,154
Pseudouridine,63
P-Site,64
Purines,39,112
pWWO, 70
Pyrazinamidase,107,144
Pyrimethamine,34,141
Pyrimidines,39,112
Pyrophosphate,98

qnrS, 139
Quinolones,36,114,128
quorum sensing,85

R100, 71,72
Racemase,98,102
Ramoplanin,30,103
r-determinint,165
rdx A, 144
Rec A, 90,92,157
recB ,90
recC, 90
recD ,90
Recipient Cells,80

Recombination,73,74,76,81,89, 90,156,158
Release factors,65
Rep A,72
rep A,72
Replication fork,47
Replicon,50,51
Replisoma,48
Reserpine,142
reservoir hypothesis,161

Partitioning,74,115
Pencillonic acid,129
penicillin amidases,16
Penicillin binding proteins,100
Penicillins,14

Penicillium notatum,14,15
Penta peptide,98
Peptidoglycan,93,94
Peptidyl Site,64
Periplasmic space,95,127
Permeability barrier,127
Phagocytosis,13
Phenoxy methyl penicillin,15
Phosphodiester bonds,41,49
Phosphonomycin,102,128
Phosphotransferase,135
Photobacterium profundum,118
Photolyase,155
Photoreactivation,155
photoreactivation enzyme,155
Piperacillin,17
Plasmid amplification,71
F/ Plasmid,82

Plasmodium falciparm,109,141
Pneumocystis carinii,34
point mutation,151,153
Polycistronic,59
Polymyxins,29,109
Polypeptide,29,59
Polyribosome,64
Porins,127
Post Antibiotic era,9
Post-segregation killing,74
Pribnow box,54
Primase,47,48
Primer,47,48,49
Procain,15
Promiscous plasmids,166
Promotor,52,54
Prontosil,33
Proofreading,154
Helix – destabilizing Proteins,49

Sewage,131
Sex pilus,68,79
Sexduction,82

Shine- Dalgarno,62
Short Sequence Repeats,44
SHV,131,133

Single stranded binding proteins,47
Sisomicin,26,27
Site-specific recombination,90

Small multidrug resistanse,141
Sme-1, 134
sok RNA , 74
SOS,156
Sparfloxacin,37
Specialized Transduction,88
Spheroplasts,101
Spiramycin,28
Splicing,58
Split genes,58
Spontaneous mutation,149
Sporulation,85

SSBs,47,49
Sterol,101,108
Stop codons,65,162
Streptococcus pyogenes,32,162
Streptococcus pneumoniae,10,17,19,20,24,45,86,98, 115
Streptococus viridans,32

Streptomyces,23,73
Streptomyces clavuligerus,20
Streptomyces griseus,26
Streptomyces lincolnensis,32
Streptomyces olivaceus,23
Streptomyces orientalis,30
Streptomyces tenabrius,139
Streptomyces venzuelae,31,120,
Streptomycin,26,118
Strptovaricins,116

Resistance Plasmid, 68
Resistance Transfer Factor,165
Resolvase,79
reverse transcriptase,114
Revertants,154
Reverted mutants,154
Rho,57
Rho dependent Termination,57
Rho independent Termination,57
Ribavirin,113
Ribonuclease,49
ribonucleotide reductase,113
Ribonucleotids,53
Ribosome Binding Site,62
Rifabutin,25
Rifampicin,25,26,157
Ristocetin,29,30
cop A RNA,72
RNA Polymerase,47,52,53,116
RNA Polymerase 1, 53
RNA Polymerase II , 53
RNA Polymerase II1, 53
RNase, 71
Rolling Circle, 80
Roxithromycin,29
rRNA,41,52,160,161
S. cattleya,23
Staphylococcus aureus,9,10,14,15,25,26,29,31,32 ,44,98,100,
S.fragilis,124

Saccharomyces,141
Saccharomyces cerevisiae,124
Salmonella enterica DT04,10
Salmonella enterica subsp. *Enterica,136*
Self-transmissible plasmid,82

Semi conservative replication,45
Semi-synthetic penicillins,16
Sense strand,52
Septation,104
Serratia marcescens,89,136

Toluene,70,129
Topoisomerase 1, 49,114
Topoisomerase II, 49,138
Toxoplasmosis,35
Trailer segment, 56
trans mobilization, 167
trans –translation,120
Transcript,56
Transcription,52
Transcription factor,52
Transfection, 87

Transferred DNA ,69
Transformation,44,85,158,168
Transglycosylation,97,100 ,103
Transition mutation,151
Translation,60
Translocation,64,119,122,123
Transpeptidation,97,99, 103,104
Transposase,75,76
Transposition,75,76,79,80
Transposons,76,77,84,89,163
Transversion mutation,151
Treponema palladium,130,138
Triacetyloleandomycin,28
Triaminobenzene,33
Tricyclic glycopeptides,30
Trimethoprime,34,112,142
Triplex DNA,42
Trovafloxacin,37
Tumer Inducing Plasmid,69
Tygacil, 25
Tyrocidins,109
Tyrocidins S, 109
UDP – N – acetyl muramic acid,102
Unasyn,22
Undecaprenyl phosphate,98

Uracil,40
Ureido-penicillins,17
Uridine triphosphate,97

Succinyl Sulphathiazine,33
Sulbactam,21,22
Sulfasalazine,33
Sulphadiamidine,33
Sulphadiazine,33
Sulphamethoxazole,34
Sulphonomides,33,140
Suppressor mutation,154
Svedberg unit, 60
Synonymous codons,152
Tautomeric forms, 154
Tazobactam, 21
S team Loop Structure,57
Teichoic acid,94,99,100
Teichuronic acid,94
Teicoplanin,30,31,103,146

Telavancin,30,103
TEM,76,131,134
Temafloxacin,37
Terminal transferase,59
Termination,53,61
TetK,160
TetL,160
tetM,63,150,164,170

tetO, 150,170
Tetracycline,23,24,120
Tetra hydrofolate(THF),34
Tetroxoprim,34
Thiacycline,24

Thiazolidine,15
Thienamycin,23,134
Thymidine,63
Thymine,40
Thymine Dimers,150
Ticarcillin,17,22
Tigecycline,25,142
Timentin,22
Tobramycin,26,27,139
Toho-1,134
Tolnaftate,111

Uronic acid,93,94
V.vulnificus,138
vanA,146
Vancomycin,25,29,30,102
vanH,145
Vibrio parahemolytica,138
Vidarabin,113
Viomycin,29
Virginiamycin M,122
Xylene,70
Yersinia,69,159

Antibiotics

Resistance of Bacteria to Antibiotics

Dr. Mohammed F. Al-Marjani

Asst. Proof

Department of Biology

2010

and Scientific Research
AL- Mustansiriya University
College of Science