الباب الثالث

المقاومة للمضاد الحيوي
ANTIBIOTIC RESISTANCE

يبحث الباب الثالث المقاومة للأدوية المضادة البكتيرية التي تمت مناقشتها في القسم الثاني. يعرض الفصل السابع موضوع المقاومة في المكروبات المنتجة – للمضاد الحيوي التي يجب أن تكون قد طورت آليات حماية ذاتية لتتجنب التدمير الذاتي أثناء إنتاج المضاد الحيوي. والآليات الهامة الداخلية الثلاثة في منتجي المضادّات الحيوية هي: (١) تعطيل نشاط المضاد الحيوي، (٢) تدفق المضاد الحيوي، و(٣) تحوير الهدف الجزيئ الحساس. وهذه الآليات تنذر المقاومات التي تكتسب عندما تصبح الممرضات البكتيرية مقاومة. ويتناول الفصل الثامن تعطيل نشاط المضادّات الحيوية في نطاق كل من التحلل المائي للبيتا– لكتام والتعديل التساهمي للأمينوغليكوسيد. ويفصل الفصل التاسع عوائل من مضخات التدفق (efflux pumps) الموجودة في الممرضات. ويشرح الفصل العاشر التعديلات على البروتين في البروتينات – المرتبطة بالبنسيلّين التي تقع تحت النمط الظاهري للمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRSA)، ومثيلة 23S Rrna (methylation) المنتشر في مقاومة الإريثروميسين، وإعادة برمجة وسائط الببتيدوغليكان في المقاومة للفامكوميسين.

		٪ العزل المقاوم لـ	
البكتيريا	حالات الوفيات	المثيسيلين	الفانكوميسين
المكورة العنقودية السالبة – للكواجيوليز	٪٢١	٪٨٠	–
المكورة العنقودية الذهبية	٪٢٥	٪٣٠	–
المكورة المعوية البرازية	٪٢٥	–	٪٢٠

ورود وخطورة العداوى المقاومة للمثسيلين والفانكوميسين. – لم تحدد.

obeikandl.com

الفصل السابع

المناعة الطبيعية والمنتجة مقابل المقاومة المكتسبة
NATURAL AND PRODUCER IMMUNITY VERSUS ACQUIRED RESISTANCE

أثناء الخمس إلى ستة عقود التي مافتئت فيها المضادّات الحيوية تتسع للعلاج، والتي تبعها تَطوُّر المقاومة للمضادّات الحيوية. والمشاهدة التاريخية وهي أنه كلما أدخل مضاد حيوي جديد، أشكال أوسع- المدى من المضادّات القائمة، أو صنف جديد من المضادّات الحيوية للاستعمال الواسع بين الناس، تظهر المقاومة المعتدة سريرياً. وربما تكون في غضون شهور (اكتشفت المقاومة للبنسيلّين في وقت مبكر مثل ١٩٤٥م) وقد تستغرق سنوات: المقاومة للفانكوميسين أخذت ما يقارب ٣٠ سنة (١٩٨٧م) بعد الإدخال السريري (١٩٥٤م). والتأخير الطويل ربما كان بسبب الاستعمال المحدد للفانكوميسين في السنوات الخمس وعشرون الأولى، ولكن عند تقدمه لخط المعالجة الأمامي، ظهرت المقاومة. وكذلك وكما سنلاحظ في الفصل العاشر، بينما المقاومة السريرية المعتدة لمضادّات للبيتالكتام قد تحدث من خلال عمل أحد منتجات الجين، فإنزيم البيتالاكتاماز الحال بالماء (hydrolytic β-lactamase)، النمط الظاهري للمكورة المعوية المقاومة للفانكوميسين (vancomycin –resistant enterococcus (VRE) phenotype) يتطلب وجود كاسيت (حافظة) (cassette) خمس –جينات ليتم تجميعها. وتستطيع فاشيات المقاومة أن تكون مبعثرة جغرافياً ولجميع أصناف المضادّات الحيوية الهامة. يبين الشكل (٧.١) خارطة الفاشيات في الولايات المتحدة خلال فترة ١١ سنة من ١٩٨٣ – ١٩٩٤م للممرضات المقاومة لكل من البنسيلّين والكيفالوسبورين، للفلوروكوينولون السبروفلوكساسين، إلى الماكروليد الإريثروميسين، وإلى الجليكوبيبتيد (البنْتيد السكري) الفانكوميسين. وأنماط مماثلة استمرت منذ ١٩٩٤م، كما سنلاحظ في الفصل السابع عشر.

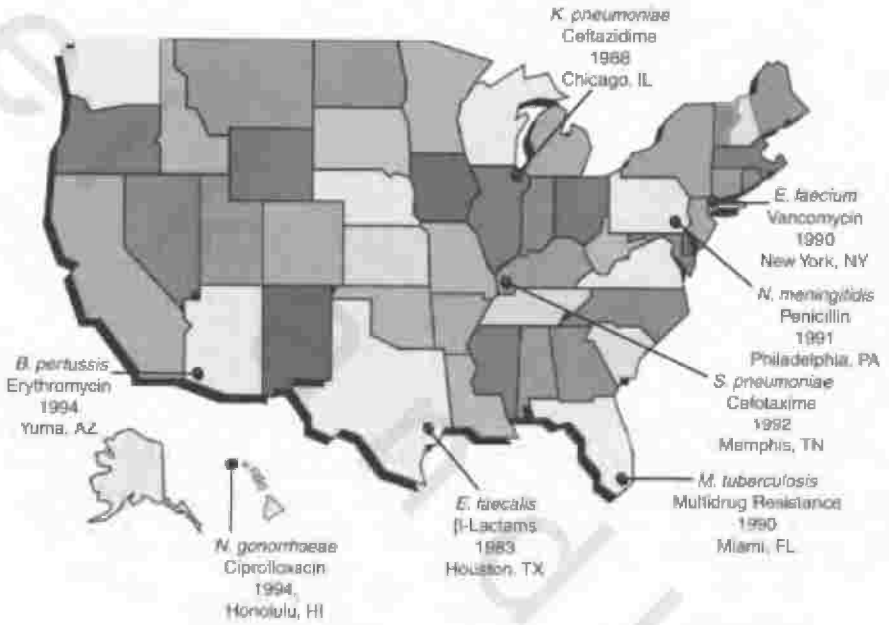
البكتيريا المقاومة – للمضادّات الحيوية تم انتقاؤها في بيئات المستشفى أسرع بكثير من المجتمع الخارجي. يوجد في المستشفيات أساساً تعرُّض مركَز وثابت للبكتيريا للمضادّات الحيوية. وفي هذه البيئات الدقيقة يوجد ضغط انتقائي (selective pressure) للبكتيريا المقاومة للمضاد الحيوي للمحافظة على هذه المُحددات، للبقاء، وحتى لتسود الجمهرة البكتيرية. ففي الجمهرة البكتيرية الكبيرة، مثلاً 10^8، التي تعرضت للدواء، يوجد تنافس موت جميع البكتيريا وتَطوُّر الطفرات النادرة التي تُحدث المقاومة. وإذا أخذنا زمن التكرار القصير لانقسام البكتيريا (يبلغ أقصر حد من ٢٠ – ٣٠

دقيقة) والتكرر النوعي لخطأ واحد لكل $١٠^{٧}$ قواعد كلما نسخ بوليميراز دنا DNA polymerase واحد دنا، وبعد ذلك فإن ١٠٠ مليون بكتيريا سوف تحتوي على حوالي ١٠ طفرات في الجمهرة. فإذا تفرقت هذه الطفرات عشوائياً في مجين البكتيريا بحجم الإشريكية القولونية، ذات ٣٠٠٠ جين، بعد ذلك ٠,٣٪ (١٠/٣٠٠٠) من الجينات سوف يكون لديها طفرة واحدة. وإذا كان أحد طفرات هذا الجين في الهدف للمضاد الحيوي والطفرة سوف تحدث بعض درجة من المقاومة التي تجعل البكتيريا أقل حساسية، وعلى إثر ذلك سوف يكون لديها ميزة البقاء الانتقائي (selective survival). وبموت جيرانها الحساسين، فسوف تبقى ويكون لها مكان للنمو وتسود المستنبت (المزرعة) وقد تنتشر بفعاليّة.

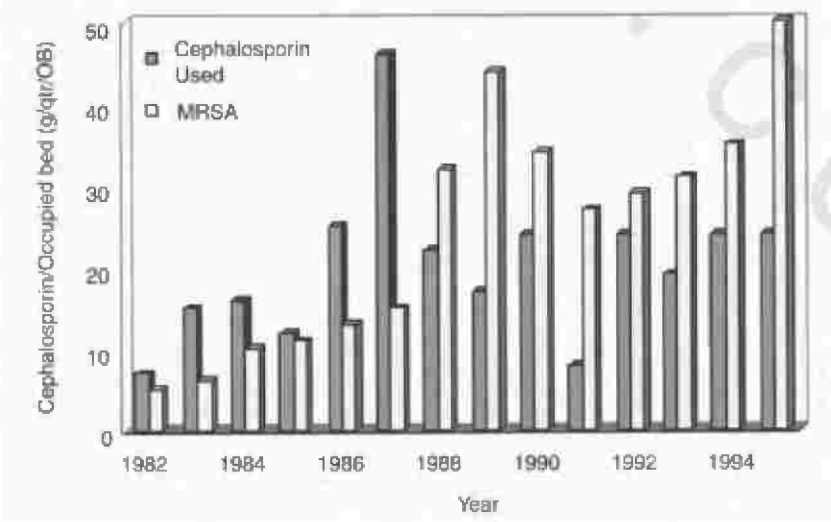
إضافة إلى النشوء المستقل لطفرات النقطة (point mutations) لتكوين جينات مقاومة، هذه الجينات تستطيع أن تتجمع على عناصر دنا قابلة للانتقال (الترانسبوسونات) (الينقولات) (transposons)، التي تعد عناصر جينية متحركة التي تستطيع أن تنتقل بين عناصر تعاقب الـ دنا على كل من عناصر متحركة أكبر (البلازميدات) (plasmids) وعلى الكروموسوم البكتيري (ينقولات اقترانية) (conjugative transposons) (انظر ويتلي وآخرون Whittle *et al.*, 2001). وهكذا فالجين المسئول عن النمط الظاهري VanA لمقاومة الفانكوميسين يوجد بشكل نموذجي على الينقول المرسّخ في البلازميد في خلايا VRE. وبشكل مماثل، غالباً البيتالاكتاماز TEM-1 ما يُحمّل بواسطة الينقول TN3 (آميز Amyes, 2001). تستطيع عناصر البلازميد بحجم دنا أن تندمج داخل مواقع ارتباط معينة على الكروموسومات لتكوين جزر مقاومة للمضاد الحيوي، كالموجودة في السالمونيلا المعوية ضرب تيفيميوريم (*Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104) (الفصل السابع عشر) والمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) (هذا الفصل). وهذا يسمح بالمحافظة على العديد من جينات المقاومة معاً. وجميع هذه الطرق تساعد على الانتشار السريع والمحافظة الثابتة لمجموعات الجينات المقاومة للمضاد الحيوي خلال جمهرة البكتيريا. ولقد وصفت (جين وآخرون Jain *et al.*, 1999) الانتقال الأفقي المكثف للجين بأنه هو عملية مستمرة في البكتيريا.

السلالات المقاومة سوف تستمر لأن تكون منتقاة بواسطة الوجود المستمر للمضاد الحيوي في البيئة الدقيقة، مثال، في جناح المستشفى. يُظهر الشكل (٧,٢) علاقة واضحة ومؤقتة على فترة ١٢ سنة بين استعمال الكيفالوسبورينات ونشوء MRSA (هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001). وبإمكان هذه التأثيرات أن تحدث كذلك في فترة زمنية مضغوطة. فعلى سبيل المثال، يعطى المريض المنوم للجراحة مضادّات حيوية للتوقية ومن ثم ولأيام قليلة بعد الجراحة للتقليل من احتمالية المضاعفات العدوائية. ودراسة تاريخ التزريع الأنفي في مثل هؤلاء السكان من المرضى (الشكل ٧,٣)، أشارت أنه في رحلة الانتشار يحتوي حجم الجزء المكافئ المعطى على $١٠^{٥}$ من بكتيريا المكورة العنقودية الذهبية، أساساً جميعها حساسة للمثسلين (MSSA) (تشينتاج وآخرون Schentag *et al.*, 1998). وبعقب الجراحة والمعالجة بواسطة كيفازولين (cefazolin) (نوع من الكيفالوسبورين)، ٩٠٪ من المرضى كانوا أُرسلوا إلى البيت بعد يومين بعد الجراحة، وبدون مضاعفات عدوائية. وكان العد الأنفي البكتيري أقل بـ١٠٠- طية إلى $١٠^{٣}$ وكان خليط من المكورات العنقودية الحساسة، المقاومة – الحدية (borderline) والمقاومة. وللمرضى الذين مازالوا في

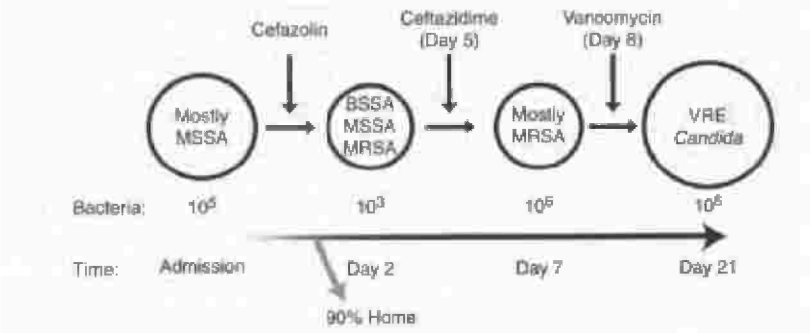
المستشفى وكانوا تحولوا في اليوم الخامس إلى كيفالوسبورين آخر (سيفتازيديم) (ceftazidime)، فعندما تمت المقايسة في اليوم السابع، كان قد ارتفع العد البكتيري أعلى من ١٠٠٠ – طية إلى $١٠^{٦}$ وكان معظمها MRSA. هؤلاء المرضى قد تم تحويلهم بعد ذلك إلى كورس فانكوميسين لمدة أسبوعين، ولهؤلاء الذين ما زالوا في المستشفى في اليوم ٢١، أظهر التزريع الأنفي $١٠^{٦}$ VRE وبعض المُبيّضة *(Candida)*. وبسبب الزمن القصير لانقسام البكتيريا، فالانتقاء – لمقاومة الدواء، والمُمْرضات – المهددة للحياة قد يكون سريع وبشكل بارز.



الشكل (٧,١). الفاشية الحديثة للبكتيريا – المقاومة للمضاد الحيوي في الولايات المتحدة خلال فترة –١١ سنة ١٩٨٣–١٩٩٤م.



الشكل (٧,٢). زمن تطوُّر المقاومة للكيفالوسبورين بواسطة MRSA.



الشكل (٧,٣). تقدم الجمهرة البكتيرية في مرضى الجراحة من MSSA إلى MRSA إلى VRE في ثلاثة – أسابيع فترة زمنية محددة. (بالإذن من تشينتاج وآخرون Schentag *et al.*, 1998).

وبالرأي السابق الذكر، تعدُّ المقاومة البكتيرية للمضاد الحيوي ليست موضوع" إذا" ولكن فقط موضوع "متى". وهذا المنطق بأنه سيكون هناك حاجة ثابتة دورات من اكتشاف وتَطوُّر مضادّات حيوية جديدة. وبمجرد إدخال المضاد الحيوي للاستعمال السريري الواسع الانتشار، فإن انتقاء الكائنات المقاومة سوف يبدأ والفترة العلاجية المحدودة سوف تحدث قبل أن تصبح مقاومة المُمْرض واسع الانتشار بشكل كافٍ لتقلل فعاليّة ذلك الدواء. بعد ذلك سيكون هناك حاجة للجيل التالي (مثال، نحن عند الجيل الرابع للكيفالوسبورينات والجيل الثالث من الإريثروميسينات) أو أصناف جديدة كاملة من المضادّات الحيوية. وهذا يفسر أكثر بقائمة البكتيريا في الجدول (٧,١) المقاومة لأصناف مختلفة من المضادّات الحيوية المستعملة سريرياً. وتتوفر المراجعة الحديثة للطرق لتقييم المقاومة المكروبية بواسطة كوكريل (Cockerill, 1999).

والعديد من المضادّات الحيوية التي تم تطويرها إلى أدوية مضادة للبكتيرية مُثْبَتَة تراكيز دنيا مثبطة (MICs) أو في بعض الأحيان تراكيز ٥٠٪ مثبطة، وغالباً في مقايسات أطباق بتري (Petri plate assays)، في حدود ١ ميكروجرام / مل. وللمضادّات الحيوية ذات الأوزان الجزيئية أقل من ٥٠٠ جرام/ مول، سيكون ذلك في نطاق تركيز ٢~ ميكرومول، وعلى سبيل المثال، فإن ٥٠٪ التراكيز المثبطة للأوكسازوليدينون (oxazolidinones) للكائنات الحساسة تكون في نطاق ١-ميكروجرام/مل، بينما تتراسيكلين MIC حول ٠,١ ربما يكون نموذجياً. وغالباً ما يكون MIC للفانكوميسين في نطاق من ٠,١ – ٠,٥ ميكروجرام/مل، و MIC للكوينولونات مثل السبروفلوكساسين أفيد أنه في نطاق من ٠,٠٥ – ٠,٥ ميكروجرام / مل للكائنات الحساسة. وربما يكون MIC للميكروليدات من عائلة الإريثروميسين في نطاق ٠,٠١ – ١ ميكروجرام / مل. ولقد تُرجمت القوى إلى نطاقات جرعات لمعالجة مفيدة لمعالجة العداوى في الإنسان. وكما أن البكتيريا تَطوُّر محدِّدات وآليات لمقاومة المضادّات الحيوية، فعندما يصل أو يتعدى MIC ٨ ميكروجرام/مل، قد يصنف الكائن كمقاوم متوسط (معتدل). والكائنات التي لها MIC أعلى من ٣٢ ميكروجرام/مل عموماً تعدُّ مقاومة سريرياً للمضاد الحيوي.

الجدول (٧,١). المقاومة البكتيرية لمختلف أصناف المضادّات الحيوية المستعملة سريرياً.

المضاد الحيوي	الصنف التركيبي	الهدف	الطفرة/ بلازميد	تدفق	مسام	تعطيل النشاط	تغيير الهدف
أمبسيلين	بنسيلّين	E	+/+	√	√	√	√
سيفترايكسون	كيفالوسبورين	E	+/+	√	√	√	√
إميبينيم	كاربابينيم	E	+ / +	√	√	√	√
فوسفوميسين	حامض الفوسفوريك	E	+ / +		√	√	
جنتاميسين	امينوغليكوسيد	R	+ / +	√		√	√
كلورامفينيكول	فينيل بروبانويد	R	+ / +	√		√	√
تتراسيكلين	بوليكيتيد (II)	R	+ / +	√		؟	√
إريثروميسين	ماكروليد	R	+ / +	√		√	√
كلنداميسين	لينكوسميد	R	+ / +			√	√
سيبرسيد	ستربتوجرامين	R	+ / +	√		√	√
تليثروميسين	كيتوليد	R	+ / +	√		√	√
سبروفلوكساسين	فلوروكوينولون	D	+ / +	√			√
فانكوميسين	غليكوببتيد	E	+ / +				√
سلفيسوكسازول	سلفوناميد	M	+ / +				
ترامبثوبريم	–	M	+ / +				
ريفامبين	أنسامبسين	P	+ / +			√	√
حامض الفيوبسيدك	ستيرويد	T	+ / +	√			√
لينيزوليد	أوكسازوليدينون	R	– / +				√
نوفوبيوسين	كومارين	D	+ / +				√
أيزونيازيد	–	M	– / +				
بيرازيناميد	–	M	– / +				
نيتروفيورانتوين	نيتروفيوران	M	– / +			(√)	
بوليميكسين	ببتيد	E	– / +	√			√
كابريوميسين	ببتيد	R	– / +			√	√
ميوبيروسين	حامض السودوموتيك	T	+ / –				√

D: تكرار، E: غلاف، M: أيض، P: حافز البلمرة رنا، R: ريبوسوم، T: ترجمة، –: صنف تركيبي غير معياري.

مقتبسة من ملصق عن آليات عمل ومقاومة المضادّات الحيوية، سي. والش، جاي. تروجر، بي. كورفالين، جاي. ديفيس (٢٠٠١)، اتجاهات في الأحياء الدقيقة، لانسيت للأمراض المعدية (The Lancet Infectiuos Disease)، الرأي الحالي في الأحياء الدقيقة (Current Opinion in Microbiology)، اتجاهات في الطب الجزيئي (Trend in Molecular Medicine).

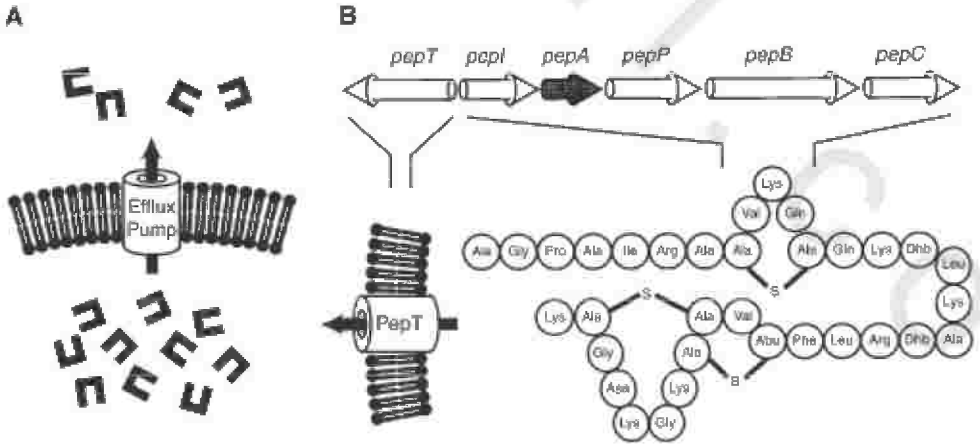
كيف تفلت منتجات المضادّات الحيوية من تدمير نفسها؟

لقد لاحظ كثير من المراقبين أن منتجات المضادّات الحيوية يمكن أن تكون عرضة لأسلحتها الكيميائية المدمرة ويجب أن تكون قد وضعت إستراتيجيات لحماية ومناعة نفسها. وقد أدى ذلك إلى المبدأ العام بأن الجينات الخاصة

بمقاومة المضادّات الحيوية والآليات يجب أن تكون قد تَطورت بالمشاركة مع القدرة على التصنيع الحيوي للمضاد الحيوي في الوقت المناسب فقط لخطة الحماية الذاتية. وفي القسم التالي من هذا الفصل سوف نفحص بعض الأمثلة التي تسلط الضوء على آليات الحماية الذاتية المختلفة التي تعمل مع البكتيريا المنتجة للمضاد الحيوي والتوقيت الذي يفتح الحماية عندما يتم الاستعداد لإنتاج المضاد الحيوي.

وكقاعدة عامة، على الرغم، فإن المضادّات الحيوية المنتجة طبيعياً تصنع بواسطة الآلآت الإنزيمية داخل الخلايا البكتيرية والمضادّات الحيوية الناضجة هي جزيئات مُفرزة. وعتاد كل منتجات المضادّات الحيوية تقريباً التي تم فحصها تشمل واحداً أو أكثر من مضخات بروتين خلال الغشاء (transmembrane protein pumps) ويفترض أن تكون مكرسة لضخ المضادّات الحيوية للخارج بمجرد صنعها وقبل أن تتراكم إلى تراكيز ضارة داخل الخلية المُنتجة (الشكل ٧.٤ A).

وعندما يتم تعاقب (تسلسل) مجموعة من جينات المضاد الحيوي، عادة ما نجد الجينات التي تُرمّز (تُشفر) مثل مضخات تصدير المضاد الحيوي هذه داخل المجموعات الناسخة، لتضمن تنسيق إنتاج مضخات التصدير بمجرد التفاف المضادّات الحيوية بعيداً عن خطوط التجميع الإنزيمية (الفصلان الثاني عشر والثالث عشر). في مجموعة Pep لانتي بيوتك، يرمز *PepA* طليعة ببتيد المضاد الحيوي ويرمز *PepT* المضخة. وقد يكون عديد من المراحل المتأخرة لتجميع المضاد الحيوي، مثال ذلك، معقد البروتين الذي يصنع بروتينات لانتي بيوتكس (بروتز وسهل Brotz and Sahl,2000) (الشكل ٧.٤ B)، يقترن جسدياً في الغشاء إلى المضخات بحيث أن تصنيع المضاد الحيوي وتوجيه التدفق من السيتوبلازم البكتيري يقترنا حركياً.



الشكل (٧.٤). رسوم تخطيطية لمضخات بروتين تدفق المضاد الحيوي: (A) مخطط عام، (B) وظيفة مضخات تدفق مضادّات لانتي بيوتكس.

إن وجود جينات في منتجات المضادّات الحيوية التي توفر مقاومة داخلية أو مناعة ذاتية توفر كذلك مخازن كامنة لهذه الجينات التي ستكون مُكتسبَة، من خلال مختلف آليات نقل الجين، بواسطة البكتيريا الموجودة في

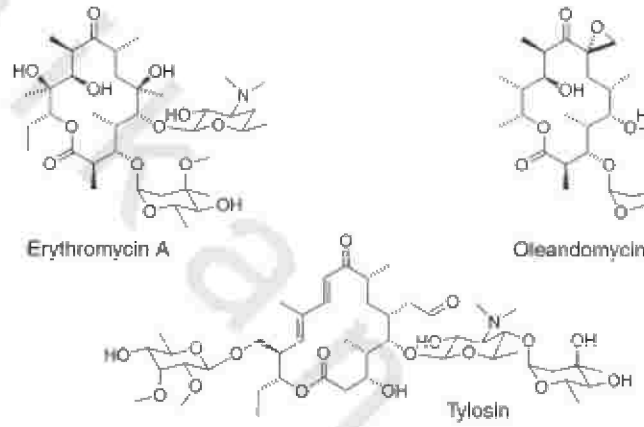
الأهداف المقصودة من المضادّات الحيوية. وبالنظر في مخازن الجينات المقاومة، فمختلف البنقولات وغيرها من العناصر الجينية المتحركة التي تعمل كأدوات نقل، والضغط الانتقائي للبكتيريا للبقاء في البيئة الدقيقة - الغنية بالمضاد الحيوي بمجرد أنها اكتسبت جينات المقاوم، فإنه من المتوقع أن سرقة هذه الجينات سيكون طريق مشترك لاكتساب المقاومة. وسوف نرى ذلك ممثلاً بوضوح وخاصة عند مقارنة خطة الحماية الذاتية في منتجات مضادّات الغليكوببتيد الحيوية والآلية التي تصبح بها المكورات المعوية المُمْرضة مقاومة للفانكوميسين (VRE).

الحماية الذاتية في منتجي الميكروليد

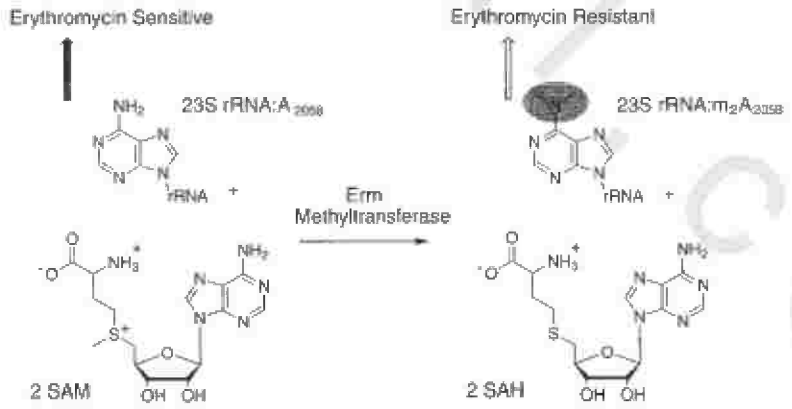
تنتج المتسلسلات (Streptomycetes) معظم مضادّات الميكروليد الحيوية المستندة على البوليكيتيد (polyketide-based)، وتشمل الإريثروميسين، وحلقة العضوية- ١٤ ذا العلاقة ميكروليد أولياندوميسين (14-membered ring macrolide pleandomycin) وحلقة العضوية-١٦ تيلوسين المُناظر (tylosin homolog) (الشكل ٧.٥، وكذلك انظر الجدول ١١.١). يختلف أولياندوميسين عن الإريثروميسين في التعديل الإنزيمي للموضع C_6-CH_3 إلى الإيبوكسيد (epoxide). وقد تم وصف ثلاث إستراتيجيات للمقاومة الذاتية في منتجات الميكروليد وآليات الإنذار للمقاومة المكتسبة في ممرضات الإنسان. التعديل الأول، بواسطة عمل الترادف لميثيل تراسفيريز Erm (Erm methyltransferase) من المجموعة الأمينية خارجية الحلقة (exocyclic amin group) من أحد فضالات الأدينين (adenine residue)، A_{2058}، في 23S RNA، في المثيلة الأحادية، أو الثنائية (المَثْيلة الأحادية أو الثنائية mono- or dimethylation). وهذه المَثْيلة —ن (N-methylation) تتعارض من ربط الإريثروميسين مع ذلك الموقع عالي- الانجذاب على الريبوسوم 50S (الشكل٧.٦، انظر كذلك الفصل الرابع). وتوجد آلية المقاومة هذه في منتجات الإريثروميسين وتيلوسين (فييرو وآخرون Fierro *et al.*, 1987، كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1889) ولكن ليس في منتجات أولياندوميسين. الآلية الثانية هي إظهار بروتينات النقل لتصدير — الميكروليد، المدعومة بالتحلل المائي لـ ATP وتعرف بالكاسيت الرابط لـ ATP (ATP-binding cassette) من نوع البروتينات (ABC). والتأكد من وظيفة ضخ التصدير تأتي من زيادة إظهار (overexpression) لبروتينات (ABC) وزيادة المقاومة للإريثروميسين، التي تمت مناقشتها أيضاً في الفصل التاسع.

الآلية الثالثة للمقاومة الذاتية، والتي تم فك شفرتها بواسطة سالاس (Salas) وزملائه (كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1998) في المتسلسلة أنتيبيوتكس *(Streptomyces antibioticus)* المنتجة للأولياندوميسين، المشاركة في التعديل الإنزيمي في نهاية مسار البناء الحيوي لتبقي الميكروليد في الشكل غير الفعال بينما ما تزال في داخل الخلية. القطعة المتممة لهذا الرسم الرائع لحماية - الذات هي أنه بمجرد أن يفرز الميكروليد فإنه يجري نحو الإنزيم خارج الخلية والتي بدورها تحوله إلى شكله الفعال. مجموعة الحماية العابرة هي مجموعة غلوكوزيل (glucosyl group) مشفرة بواسطة إنزيم غلوكوزيل ترانسفيراز (glucosyltransferase)، *oleI*، داخل مجموعة جين أولياندوميسين.

ويظهر الشكل (٧,٧) أن OleI جلوكوترانسفيريز يستعمل UDP- غلوكوز وغلوكوزيلات (C_2-OH (glucosylates من سكرديسوسامين (desosamine suage) المرافق لـ C_5 للماكرولاكتون (macrolactone) في منطقة محددة. والماكروليد الناتج، الموجود الآن مع ديسواميتيل- ٢,١ غلوكوز ثنائي السكريد (desosaminyl-2,1-glucose disaccharide) عند C_5، يعتبر غير فعال كمضاد حيوي؛ بسبب أن شطر غلوكوزيل (glucosyle moiety) التي تم إدخاله يعرقل الربط مع الوحدة الفرعية 50S للريبوسوم. وهذا لن يحدث ضرراً لخلية المتسلسلة انتيبيوتيكس المنتجة، حتى لو تراكمت إلى مستويات سامة قبل أن يتم ضخها خارجاً بواسطة نوع مضخة- ABC، البروتين OleB.



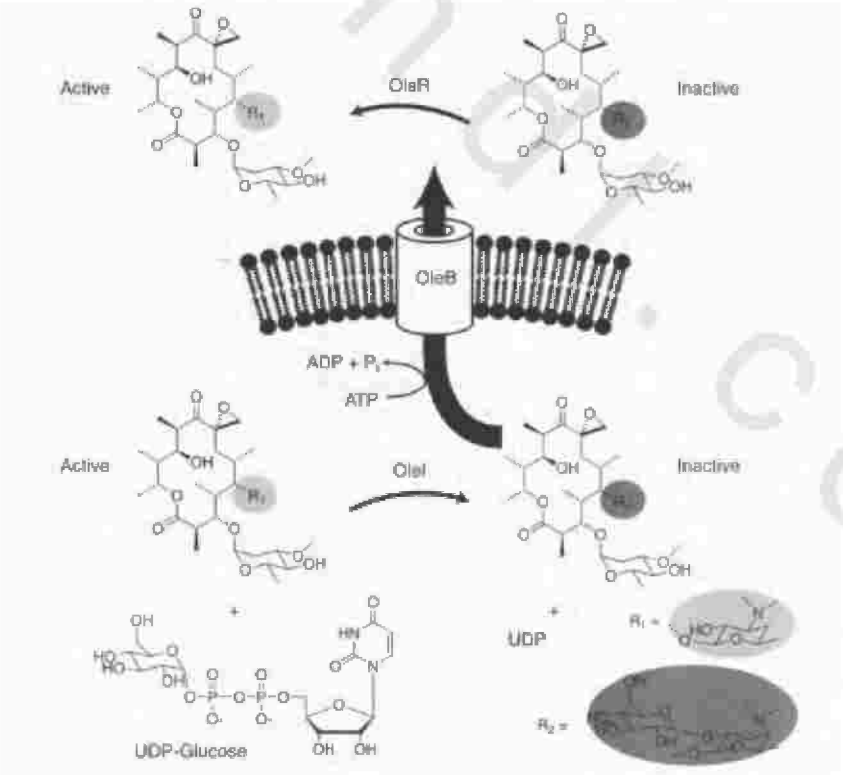
الشكل (٧,٥). تراكيب مضادات الميكروليد الحيوية الإريثروميسين A، أولياندوميسين، وتيلوسين.



الشكل (٧,٦). الأمثلة الأحادية – والثنائية الإنزيمية لـ A_{2058} في 23S rRNA في المقاومة للإريثروميسين. SAM، إس- أدينوسيل ميثونين، SAH، إس- أدينوسيل هوموسيستين.

ومن ناحية أخرى – فهذا الميكروليد المحتوي على سكر – ثلاثي، حتى لو تم شحنه خارجاً، فهو كذلك غير سام لأي من البكتيريا المجاورة . ولإعادة تفعيل الخواص المضادة الحيوية لجلوكوسيل – أولياندوميسين الكامن

هذا، فسوف تفرز المتسلسلة أنتيبيوتكس كذلك غليكوسيداز (glycosidase) وهو ناتج جين *oleR* (كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1998)، والذي الآن يزيل الغلوكوز بالتحلل المائي (hydrolytically) وينتج شكل أولياندوميسين القادر على أن يرتبط مع 50S ريبوسوم (الشكل ٧,٧). ويبدو أن آلية الشرك (decoy mechanism) هذه لا تتبع بواسطة سكاروبوليسبورا إريثري *(Saccharopolyspora erythraea)*، على الرغم من أن إنزيم EryBI يعدُّ مشابه لـOleR، مما يوحي بأنه في وقت واحد، إستراتيجية الارتباط بالغليكوزيل (glycosylation) (في الداخل) ونزع الغليكوزيل (deglycosylation) (في الخارج) قد تكون في العمل في بعض مراحل التطوُّر للمنتجين للإريثروميسين، وربما قبل أن تصبح مضخات التصدير الأمثل أو أن تتطور إستراتيجية ميثيلاز rRNA (rRNA methylase)، التي توجد في *S.erythraea* وليس في *S.antibioticus*. إحدى المميزات الأخيرة الملاحظة في حماية الذات في *S.antibioticus* هو أن مضخة OleB نقل / تدفق (OleB transport / efflux pump) سوف تضخ غليكوزيل – أولياندوميسين للخارج. كما أنه لم يحدد إلى الآن ما إذا كان لـ OleB انجذاب قليل للأولياندوميسين نفسه، بمجرد أن نزع الغليكوزيل (deglycosylated) في الوسط خارج الخلية بواسطة OleR. كما أن الانجذاب الأقل لإعادة امتصاص الأولياندوميسين من شأنه يؤثر على التدفق الصافي لنظام الضخ ليرسل غليكوزيل – أولياندوميسين خارج الخلية.



الشكل (٧,٧). الإستراتيجية للحماية – الذاتية بواسطة منتجي الأولياندوميسين: ارتباط بالغليكوزيل داخل الخلية إلى طليعة أولياندوميسين غير– فاعل بواسطة OleI، التصدير بواسطة مضخة OleB، وإعادة التفعيل بواسطة غليكوسيدات OleR.

يتعين الانتظار لنرى كيف يكون حجب المضادّات الحيوية داخل الخلية عاماً بواسطة الارتباط بالغليكوزيل (glycosylation) أو التعديل التساهمي آخر. وهناك إشارة بأن وسائط خارج – المسار في مسار البناء الحيوي للمضاد الحيوي باهليميسين غليكوبيتيد (bahlimycin glycopeptide) هي glycosylated في ما قد يكون مراقبة وظيفية وقائية (بيشوف وآخرون Bischoff *et al.*, 2001). وكما سيتم شرحه في الفصل الرابع عشر، يوجد منطق للمشابهة في منتجي إستربتوميسين حيث يكون إستربتوميسين داخل الخلية غير فاعل بسبب الفسفرة (phosophorylation) التي تُزال إنزيمياً بعد التصدير.

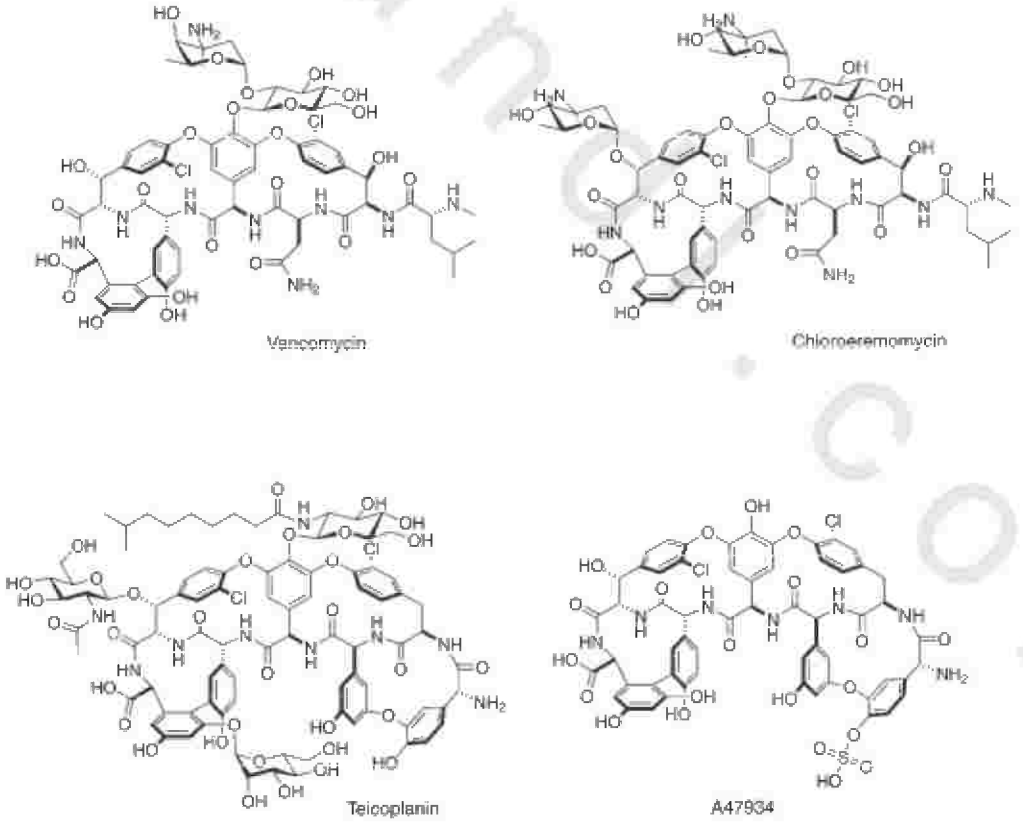
الحماية – الذاتية في منتجي أمينوكيومارين (aminocoumarin)

في البناء الحيوي لمضادّات أمينوكيومارين الحيوية المستهدفة – للجيريز (الفصل الخامس)، من المرجح أن حلقة كيومارين قد تكون تولدت نسبياً مبكراً في مسار البناء الحيوي (انظر الفصل الرابع عشر)، ولذلك فإن العديد من الوسائط في الطريق إلى نوفوبيوسين (novobiocin) من الممكن أن تكون مثبطات كامنة للإنزيم المستهدف، دنا غايراز. ولقد تم اختبار المتسلسلات المنتجة للحساسية لدنا غيراز وتم ملاحظة المقاومة الداخلية. كما أن خريطة المحددات للوحدة الفرعية GyrB من المحتمل أن تكون طفرات موقع ربط ATP المديدة والتي تضعف الحساسية الموقع لربط النوفوبيوسين (تساي وآخرون Tsai *et al.*, 1997). هذه حالة لتعديل الهدف بواسطة الطفرة لاستعادة الفعاليّة الحفّازة الأساسية بينما يقلل ربط الانجذاب للمثبط. وذلك يهدد الأسس الجزيئية لمقاومة المرض بواسطة طفرات GyrB بعد التعرض لمضادّات كيومارين الحيوية (ماكسويل Maxwell, 1997).

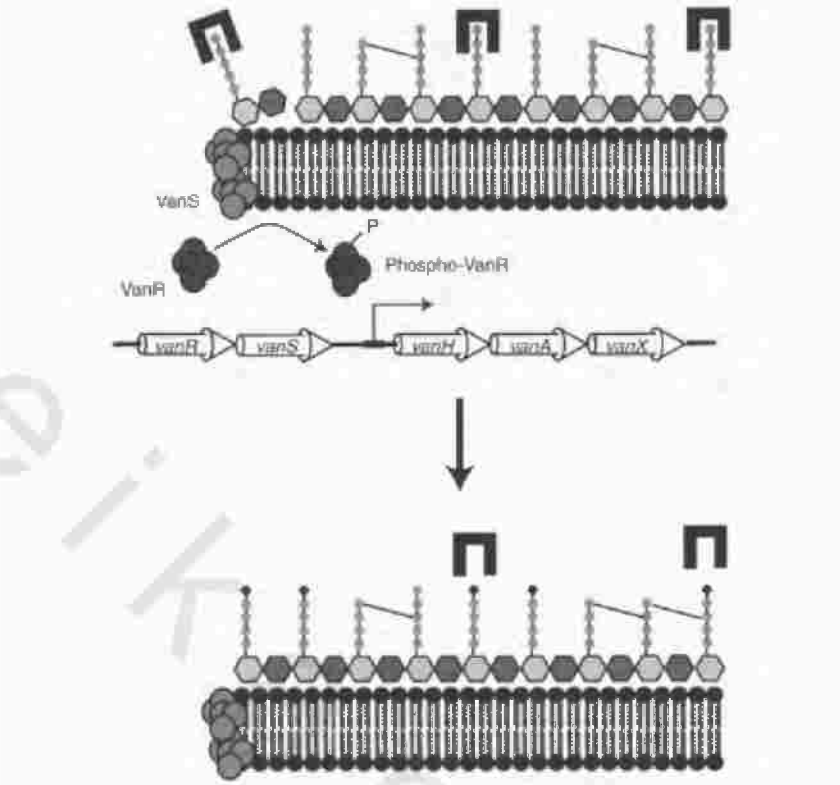
الحماية أثناء إنتاج المضاد الحيوي في المنتجين من عائلة الفانكوميسين

تُصنع المضادّات الحيوية من مجموعة الفانكوميسين بواسطة المتسلسلات (streptomycetes) وأكتينوبلانات (actinoplanes). ومجموعات الجينات لنظير الفانكوميسين، كلوروإيروموميسين (choroeromomycin) (فان واجينينجين وآخرون van Wageningen *et al.*, 1998) (الشكل ٧.٨)، ولهيكل الببْتيد السباعي (heptapeptide) البديل للتيكوبلانين (سوسيو وآخرون Sosio *et al.*) و A47934 (بوتولال وآخرون Pootoolal *et al.*, 2002)، ولقد تم تحديد تسلسل الجزء غير المرتبط بالغليكوسيل (nonglycosylated version) من التيكوبلانين من المتسلسلة تويوكانسيس (*Streptomyces toyocaensis*). وسيتم تغطية منطق تفاصيل البناء الحيوي في الفصل الثالث عشر وآليات المقاومة المكتسبة في VRE في الفصل العاشر، حيث سنلاحظ أن أنماط VRE الظاهرة تنشأ من إعادة برمجة الإنزيمات التي تصنع المحطة النهائية D-Ala-D-Ala لطليعة الببتيدوغليكان خماسي الببْتيد إلى المحطة النهائية D-Ala-D-lactate. وذلك سيقلل الانجذاب للفانكوميسين بنحو ١٠٠٠ – طية (بوق وآخرون Bugg *et al.*, 1991) وينشئ المناعة الذاتية.

وهذا الانتقال من الببْتيد الثنائي إلى ديبسيببْتيد (dipeptide to depsipeptide) يجريه ثلاثة إنزيمات مشفرة بواسطة vanH, vanA, vanX (انظر والش وآخرون Walsh et al.,1996 b). وتوجد مكافئات VanH, VanA, VanX في ترادف (tandem) كل من *S.toyocaensis* منتجي A47934 (مارشال وآخرون Marshall *et al.*, 1998) وفي منتجي التيكوبلانين، بالقرب من مجموعة البناء الحيوي للتيكوبلانين (سوسيو وآخرون Sosio *et al.*, 2000). كما تم فحص فسيولوجيا *S.toyocaensis*. والمزارع هي حساسة لـ A47934 أثناء النمو اللوغاريتمي (logarithmic growth) عندما لم يتم تصنيع المضاد الحيوي بعد. وعند تلك المرحلة من دورة الحياة، تنتج سلاسل الببتيدوغليكان D-Ala-D-Ala بواسطة D-Ala-D-Ala لبجيز (الإنزيم الرابط) (ligase ليغاز) الطبيعي. وعندما يدخل الكائن مرحلة الاستقرار (stationary phase) ويشغل الجينات لإنتاج المضاد الحيوي فإنه كذلك يُشغّل vanH,vanA,vanX لصنع D-Ala-D-lactate، بواسطة بروتين A، المعروف بـ ddlM في هذا الكائن (مارشال وآخرون Marshall *et al.*, 1997)، ليعيد برمجة طبقة الببتيدوغليكان إلى عدم الحساسية للمضاد الحيوي الذي تم صنعه الآن (الشكل ٧.٩). وهكذا فالتبديل يحدث بطريقة منسقة ومؤقتة.



الشكل (٧,٨). مضادّات الغليكوبيتيد الحيوية.

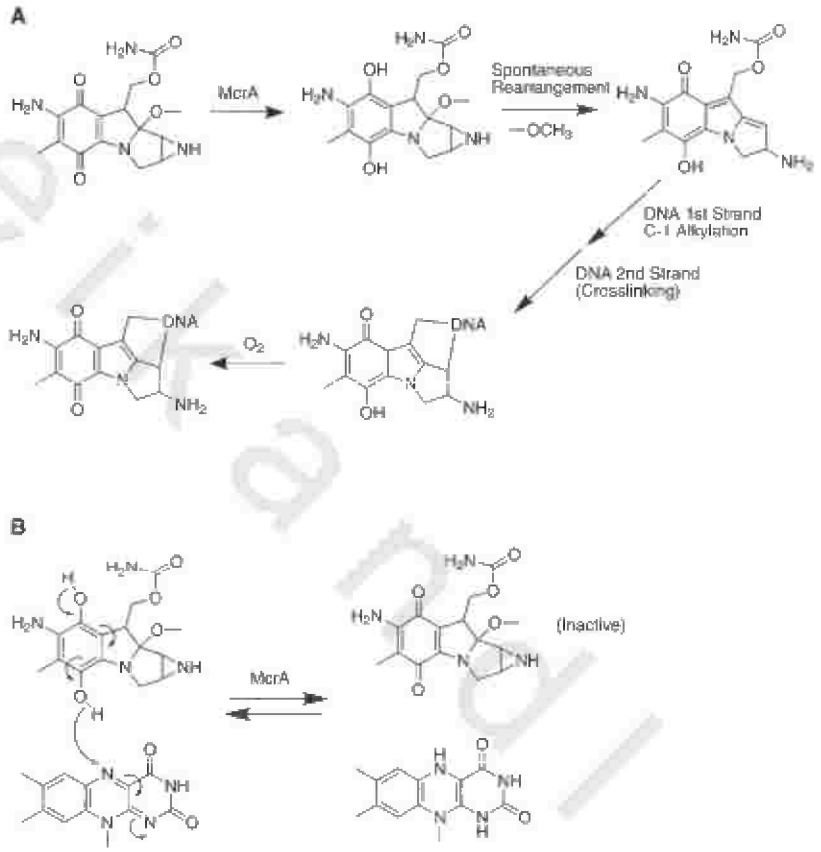


الشكل (٧,٩). تنظيم جينات vanH,vanA, vanX يساعد إعادة تركيب جدار الخلية إلى عدم الحساسية لمضادات الغليكوبيتيد الحيوية عند البناء الحيوي للمضاد الحيوي.

إستراتيجية الحماية في منتجي ميتوميسين (mitomycin)

تنتج المتسلسلة لافيندبولي *(Streptomyces lavendulae)* ميتوميسين المحتوي على كوينون سي (quinone C) والذي يعد مضاداً حيوياً مضاد للأورام بخاصية الربط – عبر التساهمي لـ دنا عند التسلسلات CpG (CpG sequences) في كلا خيطي دنا بعد الاختزال الحيوي (bioreduction) (الشكل ٨٧,١٠) لجزء بنزوكوينون (benzoquinone) للدواء بواسطة الإلكترونات ربما من السلسلة التنفسية للبكتيريا. تحتوي المتسلسلات المنتجة على جين المقاومة mcrA الذي يرمز فلافوبروتين (flavoprotein) مع العنصر المساعد فلافين أدينين داينيوكليوتيد (flavin adenine dinucleotide cofactor) الذي يساهم في الحماية المتواسطة بالأكسدة (redox-mediated protection). والميتوميسين هو دواء موالي (prodrug) في شكله المؤكسد عند إكمال بنائه الحيوي . ويجب أن يخضع إلى اختزال (reduction) الإلكترونات ومن ثم يستطيع أن يعيد ترتيبه بواسطة فقد الميثانول كوينون ميثيد (quinone methide) والذي بإمكانه الاستيلاء على الـ دنا. ويقترح أن الإنزيم المساعد لفلافين أدينين داينيوكليوتيد النشط – بأكسدة بروتين المناعة MerA يعيد أكسدة الشكل المختزل للميتوميسين في المنافسة مع، وبذلك يعرقل إعادة الترتيب ليكشف مجموعة دنا – الوظيفية النشطة (الشكل ٨٧,١٠).

وهذا يعتبر المثال الأول الذي تم الإعلان عنه لآلية الحماية – الذاتية المتواسطة — بالأكسدة في منتجي المضاد الحيوي (شيلدون وآخرون Sheldon *et al.*, 1997) ويشدد على التنوع الكيميائي الحيوي المدهش الذي سوف يستعمله منتجي المضادّات الحيوية لتوفير مناعة – ذاتية لأسلحتها الكيميائية.



الشكل (٧,١٠). ميتوميسين: (A) الربط التبادلي لـ دنا بواسطة الإختزال الحيوي المقلون (bioreductive alkylation)، (B) إعادة الأكسدة الإنزيمية لميتوميسين الثنائي المائي (dihydro mitomycin) بواسطة McrA للحمايو – الذاتية.

المقاومة الطبيعية والمكتسبة في البكتيريا المُمْرضة

الأمثلة في الفصول الأربعة السابقة تجسد النواع لآليات المقاومة المكتسبة التي من المفترض أن تكون قد تراكمت، بعضها من المصدر لهذه الجينات في الكائنات المنتجة والأخرى تطوّرت من التدبير المحلي للإنزيمات إلى مواصفات جديدة، بواسطة بكتيريا التربة التي قد تطوّرت بالمشاركة مع جيرانها منتجي المضادّات الحيوية في مئات الملايين من السنين.

للمجينات (genomes) الكاملة لمُمْرضتين من المُمْرضات البكتيرية الهامة للإنسان، الزائفة الزنجارية والمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) كُشف عن وجود إستراتيجيات مختلفة (كرودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001، ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000) للحماية – الذاتية.

Obeikandl.com

إن سلالات الزائفة الزنجارية يمكن أن تكون المتهمة الأساسية في تجرثمات الدم المهددة – للحياة في مرضى الحروق، والعوامل المسبِّبة لعداوى الجهاز البولي في المرضى بالقساطر البولية، والعوامل المسبِّبة للالتهابات الرئوية في المرضى على المتنفسات وعداوى الرئة المزمنة في المرضى المصابين بالتليف الكيسي (cystic fibrosis). ولكن هذه الزائفات (pseudomonads) عموماً أقل فوعية (ضراوة virulent) بكثير من المكورة العنقودية الذهبية وعادة ما تسمى مُمْرضات إنتهازية (opportunistic pathogens) ؛ بسبب أنها تنشئ العداوى الخطيرة بشكل كبير في المضيفين منقوصي المناعة. توجد سميتان في التحليل الأول لملاحظة مسبب إطار القراءة المفتوحة للزائفة الزنجارية PA01'5,570 (ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000). الأولى كانت في عدد أكبر من اثنين – من مكونات الجهاز التنظيمي –٥٥ إستشعار كينيزيز –٥٥ (55- sensor kinases)، ٨٩ الاستجابة المنظمة لعوامل الانتساخ (response regulator transcription factors)، و١٤ استشعار/استجابة منظم البروتينات المندمجة (14 sensor/response regulator fusion proteins) ليسمح بالمرونة في الاستجابة للمدخلات البيئية والتكامل فيما بين عديد من المدخلات خارج الخلية التي قد تجعل الزائفة الزنجارية مُمرِض ناجح (رودريجو وآخرون Rodrigue *et al.*, 2000). الثانية كانت العدد الكبير من مسامات الغشاء الخارجي: ١٩ أعضاء من عائلة OprD، ٣٤ جين من عائلة TonB، و١٨ في عائلة جين OprM. تعد الزائفات مقاومة داخلياً للعديد أو معظم المضادّات الحيوية ؛ بسبب أنها تحتفظ بتركيز منخفض صافي داخل الخلية. وسعة المسام هي مؤشر واحد، والمرتبطة منها هي مضخات التدفق (تم شرحها بالتفصيل في الفصل التاسع)، مع ١٠ من العائلة الفرعية Mex و٢٠ من العائلة الفرعية Bmr. وهذه المضخات تستطيع أن توفر الحماية ضد المُركَبات الغريبة، ولتضمن بأن معدل النفاذ / التدفق (efflux / influx ratio) هي الآن على جانب النفاذ (التدفق للخارج).

تعدُّ السلالات العالية الفوعية من المكورة العنقودية الذهبية MRSA و VRSA (المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين) مُمْرضات أكثر فوعية للإنسان في المرض وقد سُميت مُمْرضات محترفة بعكس الانتهازية التي نُوه عنها في الفقرة السابقة. وكشفت المجينات لسلالة N315 MRSA وسلالة Mu50 VRSA (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) ٣ أو ٤ مجموعة جينات في جزر الإمراضية (pathogenicity islands) و٢٦ إلى ٢٨ مجموعة جينات على العناصر الجينية المتحركة. وكلا النوعين من المجموعات يعكس الآليات حول كيف تلتقط المكورة العنقودية الذهبية الجينات من مكان آخر وتقدمها لتوظف على الفوعية والإمراضية. جميع الينقولات (الترنسبوزونات) وتسلسلات الغرس المصرح بها تصنع إلى نحو ٧٪ من مجينات المكورة العنقودية الذهبية هذه، في أنها تكاد تكون غير موجودة من بكتيريا أخرى موجبة – لغرام، العصية الرقيقة *(Bacillus subtilis)*. وهناك ما يقرب من ٧٠ إطار قراءة جديد مفتوح متورط في الفوعية تم العثور عليه بواسطة كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001). ومن حيث التقاط الجين المحدد الذي يؤدي إلى مقاومة المضاد الحيوي، الجدول (٧.٢) (استناداً إلى بيانات كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001)، لوحظ ٩ جينات التي تمنح المقاومة للمضاد الحيوي في سلالات MRSA وVRSA، وتشمل كل من *blaZ* و *mecA*

لمقاومة البيتا – لكتام (الفصلان الثامن والعاشر)، *ermA* لمقاومة الإريثروميسين (الفصل العاشر)، *ant4',ant9'*، و*aaA-aphD* لتعديل الامينوغليكوسيد (الفصل الثامن)، و *tetM* و*qacA* لمضخات تدفق الدواء (الفصل التاسع). تحتوي الجزيرة الإمراضية التي تسمى SSC_{mec} على الجينات *bleO, blaZ, mecA, ermA* و *ant4'* ومن الواضح أنها المحددات الجينية التي تساهم في براعة سلالات MRSA كمُمْرِضات محترفة (هيرماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001).

الجدول (٧,٢). جينات المقاومة للمضاد الحيوي الموجودة في MRSA.

البروتين	الجين	مقاومة المضاد الحيوي
البروتين المقاوم للبليوميسين	bleO	بليوميسين
PBP2'	*mecA*	بيتا– لكتاميز
بيتا – لكتاماز	*blaZ*	بيتا– لكتامز
rRNA ميثيلاز	*ermA*	إريثرزميسين، بريستينااميسينات
أو – نيوكليوتيديل ترانسفيراز	*ant 4', ant 9'*	أمينوغليكوسيدات
أسيتيليز – فوسفوترانسفيراز	*AacA-aphD*	أمينوغليكوسيدات
TetM بروتين التدفق	*tetM*	تتراسيكلينات
QacA	*qacA*	المطهرات

ولقد تم اختبار حساسية البكتيريا للأدوية المضادة البكتيرية كلاسيكياً بواسطة المقايسات الظاهرية التي تقيم قابلية المضاد الحيوي لتثبيط نمو البكتيريا تحت ظروف نمو معينة. وبالإمكان استخدام صيغ مختلفة، تشمل مقايسات انتشار القرص (disk diffusion)، وتخفيف الإيغار (agar dilution)، وتخفيف المرق (broth dilution).

وعلى سبيل المثال، فالأقراص المشبعة بمادة الكيفالوسبورين غير الملونة، نيتروسيفيم (nitrocefem) يمكن استخدامها لاختبار البكتيريا التي تنتج بيتا – لكتاميز. ويؤدي فتح الحلقة في حلقة لاكتام للنيتروسيفيم إلى التخلص من مادة نيتروالعطرية (nitroaromatic) الغنية بالإلكترون المستبدلة الصفراء، وهكذا ينتج عن الاختبار تَطوُّر اللون. وفي الآونة الأخيرة، أصبحت الطرق التي تقيم النمط الجيني للمقاومة للمضاد الحيوي مباشرة بدلاً من النمط الظاهري للحساسية أكثر استعمالاً (تمت المراجعة بواسطة كوكوريل Cockerill, 1999) وبالأخص عندما تكون الطفرات السائدة المُسبِّبة للمقاومة معروفة وبالإمكان بسهولة فحصها وراثياً. وعلى سبيل المثال، بالإمكان الكشف بسهولة عن وجود جين *mecA* في العزل المكوراتي العنقودي السريري بواسطة PCR (تفاعل سلسلة حافز البلمرة) لمنطقة من *mecA*، يتبعها تحليل الرحلان_الكهربائي للهلام (gel electrophoresis). كما أنه بالإمكان الكشف بسهولة عن وجود جين *mecA* على الهلام المصبوغ بواسطة بروميد الإثيديم (ethidium bromide) (كوكريل Cockerill, 1999). وبشكل مناظر، فإن

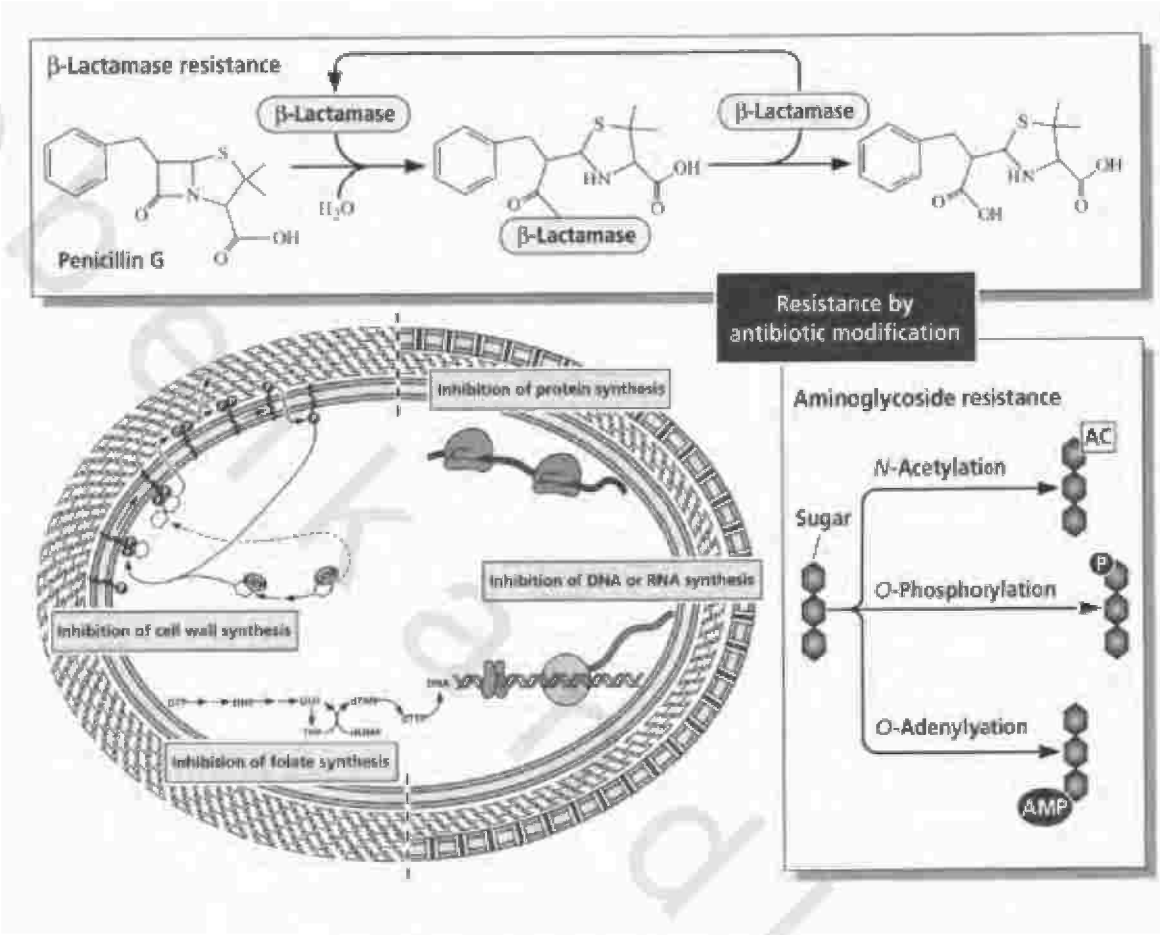
اكتساب الجينات من عائلة TEM- بيتالاكتاماز (TEM β-lactamase family) الذي يحدث مقاومة سريرية للسيفتازيديم، سيفوتاكسيم وأزتريونام (انظر الفصلان الثالث والثامن) في عزل الكلبسيلة الرئوية (Klebsiella pneumoniae) والإشريكية القولونية، يمكن بسهولة الكشف عنه بواسطة تحليل PCR وتقييد جزء من طول متعدد الأشكال (restriction fragment length polymorphism) (كوكريل Cockerill, 1999). ولقد تم الكشف عن مقاومة الريفامبين في المتفطرة السلية بواسطة تحليل PCR للطفرات في جين *rpoB* الذي يرمز للوحدة الفرعية بيتا لحافز بلمرة رنا بينما مقاومة الكوينولون يتم الكشف عنها بواسطة تحليل PCR وتعاقب تسلسل دنا لأجزاء من جين *gyrA* الذي يرمز الوحدة الفرعية *GyrA* لإنزيم دنا غايراز، والمسئول بفعاليّة عن جميع المقاومة السريرية للكوينولون (كوكريل Cockerill, 1999).

والخلاصة، أن الطرق الثلاثة للحماية الذاتية في منتجي مضادّات الميكروليد الحيوية التي لوحظت في الشكل (٧,١١)، مهدت لمرحلة لفهم الإستراتيجيات الثلاث الرئيسة لمقاومة البكتيريا للمضادّات الحيوية التي سوف نكشف عنها في الفصلان الثامن والعاشر. الأولى ممثلة بالتعطيل المؤقت للشكل داخل الخلية للمضاد الحيوي في منتجي أولياندوميسين. والمشابهة في المُمْرضات المقاومة بالإمكان وصفها بالتدمير الإنزيمي للمضاد الحيوي، كما هو الحال في الإنحلال المائي للبيتا لكتام، تحوير (تبديل) الامينوغليكوسيد، وأسر الفوسفوميسين (fosfomycin capture) بواسطة جلوتاثيون (glutathione) (الفصل الثامن). إن تدفق المضادّات الحيوية الداخل الخلوية الممارسة بواسطة المنتجين، والموضحة بفعل مضخة OleB هو نذير لإستراتيجية عامة لخفض التركيز المحيط للمضادّات الحيوية داخل خلايا المُمْرضات.

طريقة الحماية – الذاتية للمنتج	تعطيل النشاط المؤقت للمضاد الحيوي داخل الخلية	تدفق المضاد الحيوي المنتج	تعديل الهدف في المنتج
مثال على الحماية – الذاتية لمنتج الميكروليد	تسكير الأولياندوميسين	تصدير الأولياندوميسين بواسطة OleB	نزع الميثيل من الإدينين في 23S rRNA 23S rRNA:m_2A2085
الطريق المشابهة للمقاومة البكتيرية السريرية الملاحظة	تعطيل نشاط المضاد الحيوي	تدفق المضاد الحيوي	تعديل الهدف

الشكل (٧,١١). التشابه بين الحماية – الذاتية للمنتجين والمقاومة البكتيرية.

وهذا يمكن أن يكون مزيج من معدلات تدفق منخفضة تعمل غالباً في البكتيريا السالبة – لغرام من خلال نفوذية حاجز الغشاء الخارجي، بالإضافة إلى معدلات التدفق المتسارعة. وبإمكان بروتينات مضخة التدفق أن يكون لها ألفة (نوعية) ضيقة (narrow specificity)، مثال، بروتين TetB للتراسيكلين، أو أن يكون لها انتقائية واسعة، كما هو الحال مع بروتينات مضخة التدفق متعدِّدة الدواء (الفصل التاسع). والآلية الثالثة هي أن المُمْرض يغير البروتين الهدف بحيث أنه يظل يحتفظ بوظيفته الفسيولوجية ولكن الآن له انجذاب أقل للربط مع المضاد الحيوي (الفصل العاشر). وفي بعض منتجي الإريثروميسين، ما تزال هذه الإستراتيجية معمول بها بواسطة المثيلة الثنائية A_{2058} *N,N*-dimethylation في 23rRNA لتصنع وحدة 50S الفرعية المقاومة. وتحوير (تبديل) الهدف في المُمْرضين يمكن أن يكون طفرات في أو استبدال البروتين – البري (wild- type protein)، كما هو الحال في البروتينات المرتبطة – بالبنسيلّين، أو تبديل في الركيزة (المادة) للإنزيم الرئيسي، كما في إعادة برمجة D-Ala-D-Ala-D-lactate.



تعديل المضادّات الحيوية بواسطة البكتيريا المقاومة