مجلة العلوم الطبية والصيدلانية
العدد الثالث – المجلد الثاني
سبتمبر 2018 م
ISSN: 2522-333X

المجلة العربية للعلوم و نشر الأبحاث
Arab Journal of Sciences & Research Publishing
AJSRP

التأثير المضاد للبلازميدات لبعض المستخلصات النباتية تجاه بكتريا المكورات المعوية المقاومة للعلاجات

محسن أيوب عيسى
قسم علوم الحياة || كلية العلوم || جامعة الموصل || العراق

الملخص: تعد مشكلة المقاومة المتعددة للعلاجات(Multiple drug resistance (MDR من أهم التحديات الصحية العالمية التي تتطلب البحث المستمر في معالجتها، وتقع معظم المحددات الوراثية المسؤولة عن هذه المقاومة على البلازميدات. أجري هذا البحث بهدف دراسة التاثير المضاد للبلازميدات في المستخلصات الكحولية لنبات السماق Sumach (RhusCoriaria) ونبات الميرامية Sage (Salvia officinalis) تجاه بكتريا المكورات المعوية Enterococci المقاومة للمضادات الحيوية. أظهرت اختبارات حساسية عزلات هذه البكتريا تجاه المضادات الحيوية المدروسة أن جميع العزلات تمتلك انماط مختلفة من المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وصلت إلى حد تسعة من أصل أربعة عشر مضاداً حيوياً، وأبدت جميع العزلات مقاومة مطلقة بنسبة (100%) للمضادين الحيويين Amikacin وNaldixic acid. وفي دراسة فعالية كل من المستخلص الكحولي للميرامية والسماق المضادة للبلازميدات تجاه العزلات المنتخبة تم إثبات صفة التحييد البلازميدي لهذين المستخلصين ولأول مرة بالتركيز (2000) مايكروغرام/سم^3 تجاه عزلات هذه البكتريا عن طريق فقدان صفة المقاومة للمضادات الحيوية مظهرياً (Amikacin وAmpicilling وNaldixic acid وTetracycline) والفقدان المادي للبلازميدات جزيئيا (بلازميدين بحجم 4000bp و3500bp)، مما يثبت وجود الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات المذكورة اعلاه على البلازميدات المُحَيَّدَة، بالتالي فإن هذه النتيجة تفتح الطريق أمام إمكانية استخدام هذين النباتين بعد دراسات إضافية لمعالجة مشكلة المقاومة العلاجية في بكتريا المكورات المعوية والبكتريا المرضية الأخرى.

الكلمات المفتاحية: بلازميد، مستخلصات نباتية، المكورات المعوية، MDR.

المقدمة

تعد المضادات الحيوية من أهم الاكتشافات الصحية واحد الاركان الأساسية في الطب الحديث، وفي ذات الوقت فإن الاستخدام المفرط وسوء استخدام هذه المضادات في الطب البشري والبيطري والأغراض الزراعية على مدى السنوات السبعين الماضية أدى إلى تلوث البيئة بهذه المضادات وبالنتيجة ظهور عدد لا يحصى من الكائنات المجهرية المقاومة للأدوية، إذ أصبحت العديد من أنواع البكتريا في المؤسسات الصحية مقاومة للمضادات الحيوية تاركة القليل من الخيارات العلاجية وبالتالي أصبحت هذه المقاومة خطرا كبيرا يهدد صحة الإنسان (Xu *et al.* 2007; Rosvoll 2012).

يعد ظهور البكتريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية الشائعة مشكلة صحية خطيرة وتحدي كبير لبرامج التطور العلاجي العالمية وتفاقمت هذه المشكلة بشكل واضح مع انخفاض عدد المضادات الحيوية الجديدة المكتشفة خلال العقود الاخيرة في الوقت الذي يزداد فيه عدد أنواع البكتريا المرضية المقاومة للمضادات الحيوية ومنها جنس المكورات المعوية ذات الدور المتزايد في اصابات عدوى المستشفيات، إذ تكتسب هذه البكتريا جينات المقاومة للمضادات الحيوية من خلال انتقال البلازميدات والعناصر الوراثية القافزة أو الطفرات أو التبادل الكروموسومي وقد وصف عدد كبير من اليات المقاومة للمضادات الحيوية في افراد هذا الجنس(Diarra *et al* ., 2010). كما أن تواجد المكورات المعوية في امعاء الإنسان يجعلها في موقع مناسب لاكتساب جينات المقاومة للمضادات الحيوية وهذا

ما يجعل علاجها صعبا ويمنحها القدرة على نقل هذه الجينات إلى غيرها من أنواع البكتريا المرضية (2011، de-Nidrehausern *et al.*)

إن الكثير من المحددات الوراثية التي تمنح مقاومة للمضادات الحيوية تقع على البلازميد والتي غالبا ما تنتقل إلى أنواع أخرى من البكتريا في المحيط وتكون مسؤولة عن ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وأن استخدام العوامل المحيدة للبلازميد سويا مع المضادات الحيوية قد يوفر طريقة لمنع تطور وانتشار هذه المقاومة، ولكن غالبية العوامل المحيدة المعروفة مثل الاكردين البرتقالي وبروميد الاثيديوم والـ (SDS) Sodium Dodecyle Sulphate تكون سامة ومطفرة لذا فهي غير مناسبة لاختبارها داخل جسم الكائن الحي للاغراض العلاجية ومن هنا جاءت الحاجة إلى تطوير عوامل محيدة جديدة ، امنة وذات كفاءة عالية، وأن تشخيص عوامل محيدة جديدة من اصل نباتي امر مهم كون غالبية المكونات الطبيعية غير سامة للإنسان والبيئة (Shriram *et al* ،2010.). هناك العديد من المركبات النباتية التي تتداخل في عملية تضاعف البلازميدات والنتيجة تكون بفقدان البلازميد، وبهذا ممكن أن تكون المحيدات المشتقة من النباتات الاختيار المناسب لاكتشاف مواد جديدة تهدف إلى السيطرة على تطور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية (Latha *et al.* 2009.; Schelz *et al.* 2006;،Lakshmi *et al.* 1987). يهدف البحث الحالي إلى دراسة دور بعض هذه المستخلصات النباتية (السماق Sumach و الميرامية Sage) كعوامل محيدة في ازالة صفة المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة المكورات المعوية مظهريا وجزيئيا.

المواد وطرائق العمل

1- المواد

العزلات البكتيرية

استخدم في هذا البحث تسعة عزلات من بكتريا المكورات العوية Enterococcus من نوع E.faecalis معزولة ومشخصة في قسم علوم الحياة /كلية العلوم/جامعة الموصل- العراق.

النباتات المدروسة

تم الحصول على النباتات المدروسة من الأسواق المحلية لمدينة الموصل/العراق وشملت كل من نبات السماق (البذور) Sumach (Rhus Coriaria) من العائلة Anacardiaceaeكذلك نبات الميرامية (الأوراق والسيقان) Sage (Salvia officinalis) من العائلة Lamiaceae وتم التحقق من أصناف هذه النباتات في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/جامعة الموصل- العراق.

2- طرائق العمل

فحص الحساسية للمضادات الحيوية

أُستُخدِمَت المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bioanalyse التركية وأُجرِيَ الاختبار باستخدام طريقة Kirby Bauer المحورة واستنادا إلى (Vandepitte et al، 2003).

تحييد البلازميدات باستخدام المستخلصات الكحولية النباتية (السماق والميرامية)

- **تحضير المستخلصات النباتية الكحولية**

حضر المستخلص الكحولي للنباتات المدروسة باستخدام الكحول الاثيلي بتركيز 95 % واستنادا إلى طريقة (Kabiru. et al ، 2017).

- **تقدير التركيز الادنى المثبط (MIC)**

تم تقدير MIC (Minimal inhibitory concentration) للمستخلصات الكحولية لنباتي السماق والميرامية، باستخدام تقنية Macro broth dilution assay إذ حُضِّرَتْ أنابيب حاوية على 10 سم^3 من وسط المرق المغذي وتراكيز مختلفة من المستخلص النباتي (500، 1000، 2000، 3000، 4000 و 5000 مايكروكرام/سم^3)، لُقِحَتْ هذه الأنابيب ب 0.1 سم^3 من المعلق البكتيري القياسي وحُضِنَتْ الأنابيب بدرجة حرارة 37 ^{o}م لمدة 24 ساعة، وتم تحديد الانبوب الاول من سلسلة الأنابيب اعلاه والذي لا يحتوي على اشارة للنمو على انه التركيز الادنى المثبط MIC (2010 ،. Motamedi *et al*).

- **تحييد المحتوى البلازميدي باستخدام المستخلصات النباتية**

أُجريَت عملية تحييد المحتوى البلازميدي باستخدام المستخلصات الكحولية لنبات السماق والميرامية بتراكيز أقل من التركيز المثبط الادنى حيث أُستُخدِمَت التراكيز 1000، 2000 و3000 مايكروغرام / سم3 لكلا النوعين من المستخلصات، لقح 10 سم^3 من وسط المرق المغذي بـ 0.1 سم^3 من مزرعة فتية للعزلات المنتخبة والمتعددة المقاومة قيد الدراسة ، وأُضيفَت المستخلصات النباتية بالتراكيز النهائية المذكورة اعلاه للأنابيب ، وحُضِّنَتْ بدرجة حرارة 37 ^{o}م لمدة 24 ساعة ، وتم تحضير الطبق الرئيسي
Master plate ثم نُقِلَتْ مستعمرات الطبق الرئيس إلى أوساط المضادات الحيوية التي كانت تقاومها العزلات الاصلية، وحُضِّنَتْ الاطباق بدرجة 37 ^{o}م لمدة 24 ساعة ثم سُجِلَتْ النسبة المئوية للتحييد من خلال حساب عدد المستعمرات غير النامية نسبة إلى عدد المستعمرات النامية (Beg and Ahmed ،2000).

- **التحييد باستخدام درجة حرارة 37 ^{o}م (تحييد التلقائي) ودرجة حرارة 48 ^{o}م**

أُجريَت عملية التحييد للمحتوى البلازميدي للعزلات المنتخبة من جرثومة المكورات المعوية وذلك باستخدام درجتي حرارة 37 ^{o}م و 48 ^{o}م إذ لقح 5 سم^3 من وسط المرق المغذي بمستعمرة فتية من العزلات البكتيرية وحُضِّنَتْ لمدة 24 -18 ساعة عند درجة حرارة 37 ^{o}م، ثم اخذ 0.1 سم^3 من المزرعة البكتيرية وأُضيفَ إلى 5 سم^3 من وسط المرق المغذي وحُضِّنَتْ عند درجة حرارة 37 ^{o}م و 48 ^{o}م لمدة 24 ساعة ، حُضِّرَتْ تخافيف عشرية من هذه المزرعة ثم نشر 0.1 سم^3 من التخافيف الثلاثة الاخيرة على اطباق الاجار المغذي Nutrient Agar (Oxoid) باستخدام ناشر زجاجي معقم ثم حُضِّرَ الطبق الرئيسي Master plate الحاوي على 100 مستعمرة لكل عزلة ثم نقلت هذه المستعمرات إلى أوساط المضادات الحيوية المحضرة سابقا لملاحظة تأثير العامل المحيد تم التعبير عن كفاءة التحييد باستخدام النسبة المئوية للمستعمرات التي حيدت من اصل 100 مستعمرة (Shriram *et al.*)، 2008; Kandela *et al.*، 2011.

استخلاص الـ DNA البلازميدي

أُستُخدِمَت طريقة عزل البلازميدات التي وصفت من قبل الباحثين Brinboim وDoly مع إجراء بعض التحويرات حسب الطريقة المتبعة من قبل Al- Dorri وآخرين (2001) وكما يلي:

- لقح 50 سم^3 من وسط المرق المغذي الحاوي على المضاد المناسب بمستعمرة فتية من العزلات البكتيرية، حُضِّنَتْ المزرعة في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 37 °م مدة 24 ساعة.
- أخذ 1.5 سم^3 من المزرعة البكتيرية النامية ووضعت في أنابيب Eppendrof ورسبت الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي عند 8000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
- عُلِقَتْ الخلايا بـ 0.1 سم^3 من المحلول المكون من(Lysozyme، (20%) Glucose، (1M) Tris–Hcl، Na_2 EDTA (0.1M)، Distil water) ووضعت بالحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 35 دقيقة ثم وضعت الأنابيب في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة.
- أضيفَ 0.2 سم^3 من المحلول المكون من((2M) Sodium hydroxide، (10 Sodium Dodecyle Sulphate SDS (%، Distil water) ومزجت الأنابيب جيدا ووضعت في حمام ثلجي لمدة 5 دقائق.
- أُضيفَ 0.15 سم^3 من محلول ((3M) Sodium Acetate) ومزجت الأنابيب جيدا ووضعت في حمام ثلجي لمدة45 -60 دقيقة ثم أُجرِيَ طرد مركزي لمدة 5 دقائق اهمل الراسب ونقل الراشح إلى أنابيب Eppendrof نظيفة ومعقمة.
- أُضيفَ 1 سم^3 من الايثانول المبرد (95%) إلى الأنابيب الحاوية على الراشح ومزجت العينة وضعت في درجة حرارة - 20 م° لمدة 30 دقيقة.
- جمع DNA البلازميدي بإجراء الطرد المركزي عند 8000/ دقيقة للعينة من الخطوة السابقة لمدة 10 دقائق وعلق الراسب بـ 0.1 سم^3 من المحلول((0.1 M) Sodium Acetate، (0.5 M) Tris –Hcl).
- أُعيدَ ترسيب الـ DNA البلازميدي باضافة 1 سم^3 من الايثانول المبرد (95%) ووضعت الأنابيب في - 20 °م لمدة 30 دقيقة ثم أُجرِيَ طرد مركزي للتخلص من الايثانول.
- أُذيبَ الراسب بـ 20 مايكروليتر من محلول((10 mM) Tris –HCl، (1mM) Na_2 EDTA).
- حُفِظَ البلازميد في قناني زجاجية معقمة في الـ Deep freeze لحين الاستعمال.

الترحيل الكهربائي

أُستُخدِمَت طريقةAabo وآخرون، (1995) في إجراء تجربة الترحيل الكهربائي الهلامي لغرض تحديد المحتوى البلازميدي للعزلات المدروسة والتي اجريت عليها تجارب التحييد وكما يلي :

- حُضِّرَ الاجاروز باذابة 0.8 غم منه في 100 سم^3 من المحلول المنظم Alec's Buffer وتمت الاذابة بدرجة الغليان عن طريق وضعة على جهاز التحريك المغناطيسي Heating magnetic stirrer.
أُضيفَ اليه 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لمركب Ethidium Bromide المتألق لغرض صبغ حزم الـ DNA.
- بُرِّدَ المحلول إلى درجة 55 °م وتم تركيب قالب الهلام Gel tray ثم وضع المشط Comb لصنع الحفر Wells التي تستخدم لتحميل عينات الـ DNA.
- سُكِبَ الاجاروز بعناية في القالب وترك الهلام إلى أن يتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وبعدها رفع المشط بهدوء من الهلام.

- أُضيفَ 5 مايكروليتر من محلول التحميل الصبغي إلى 10 مايكروليتر من نماذج الـ DNA ثم حمل بعناية في حفر الهلام.
- وُضِعَ هلام الاجاروز في جهاز الترحيل الكهربائي ثم ملئ بالمحلول المنظم Alecs Buffer بحيث غمر الهلام في المحلول المنظم وشغل مجهز القدرة الكهربائية Power supply المجهز من شركة Lebnet التايوانية المنشأ وضبط عند 80 فولت لمدة3 ساعات وبذلك سوف تتحرك جزيئات الـ DNA البلازميدي الموضوعة في جهة القطب السالب نحو القطب الموجب.
- فُحِصَ الهلام المصبوغ في غرفة مظلمة بوضعه في جهاز الاشعة فوق البنفسجية ولوحظ ظهور حزم الـ DNA البلازميدي وَصُوِّرَ الهلام بالكاميرا الرقمية.
- قُدِّرَ الحجم الجزيئي لقطع الـ DNA بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي DNA- Ladder.

النتائج والمناقشة

مقاومة المضادات الحيوية في عزلات بكتريا المكورات المعوية:

تعد صفة المقاومة العلاجية في بكتريا المكورات المعوية وانتقالها في البيئة من اهم الصفات التي ساعدت على حيوية وبقاء وانتشار هذا الجنس، وأن العامل الوراثي المتمثل بالمادة الوراثية المتحركة كالبلازميد والعناصر الوراثية القافزة وغيرها ساعدت على انتشارها في البيئة، كما تعد المكورات المعوية كائنات ذات قدرة واضحة للتكيف مع المحيط واكتساب المحددات الخاصة بالمقاومة المكتسبة، إذ أن تواجدها في الامعاء كبيئة طبيعية لها ساعدها بشكل كبير على اكتساب تلك المحددات (de- Nidrehausern *et al*.2011 ; Arias *et al*. 2010).

أُختُبِرَتْ حساسية عزلات المكورات المعوية تجاه (14) نوع من المضادات الحيوية الجدول(1)، حيث يلاحظ أن العزلات اظهرت مقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية المدروسة، وفي حالة المقاومة المنفردة (مقاومة جميع العزلات تجاه مضاد حيوي واحد) اوضحت النتائج تباينا في نسب هذه المقاومة وأن اعلى نسبة مقاومة منفردة (100%) كانت في حالة المضادين Amikacin و Naldixic acid إذ تؤكد دراسات أخرى مقاومة المكورات المعوية العالية لهذين المضادين(Gajan *et a*، 2008. ،2002 Rodrigues *et al*.) بينما كانت العزلات حساسة بصورة مطلقة للمضادات Gentamicin، Penicillinو Vancomycin **وتدرجت المقاومة المنفردة تجاه المضادات الأخرى بين هاتين النسبتين**. أن ارتفاع نسبة المقاومة المنفردة يساعد وبشكل كبير على تطور ما يسمى بالمقاومة المتعددة(Multi- (MDR drug resistance.

الجدول (1) نتائج فحص حساسية عزلات المكورات المعوية المدروسة تجاه المضادات الحيوية.

رقم العزلة	المضادات الحيوية														% للمقاومة المتعددة
	AK	AM	C	CIP	E	CN	IMP	NA	P	RA	TE	VA	DA	TMP	
1	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	35.7
2	R	I	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S	21.4
3	R	R	S	R	R	I	R	R	I	R	R	S	S	R	64.2
4	R	R	S	R	I	S	R	R	I	R	R	S	S	R	57.1
5	R	R	S	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	28.5
6	R	R	S	I	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	50

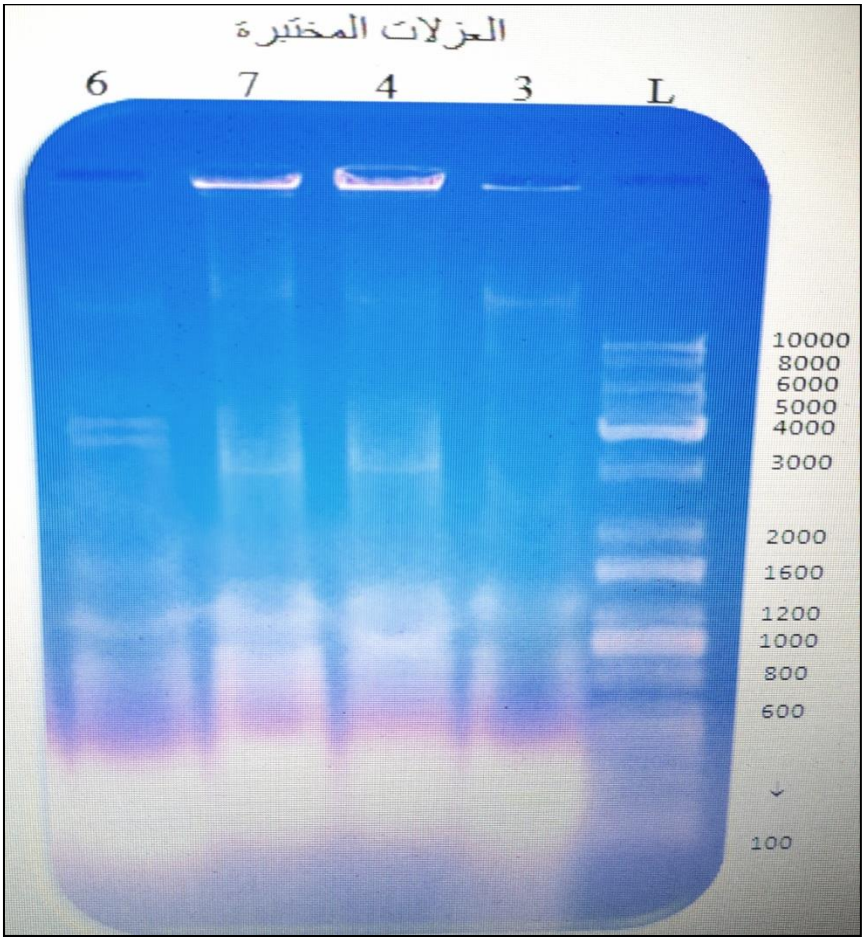
رقم العزلة	المضادات الحيوية														% للمقاومة المتعددة
	AK	AM	C	CIP	E	CN	IMP	NA	P	RA	TE	VA	DA	TMP	
7	R	R	I	I	R	S	S	R	I	R	I	S	R	S	42.8
8	R	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	14.2
9	R	I	S	I	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	14.2
% للمقاومة المنفردة	100	55.5	11.1	22.2	33.3	0.0	22.2	100	0.0	55.5	44.4	0.0	44.4	22.2	

نمط المقاومة المتعددة يعني مقاومة ثلاث مضادات حيوية أو أكثر (Al- Jarousha et al ،2008.). وتبين من نتائج هذه الدراسة أن جميع العزلات كان لها نمط (MDR)، وكل عزلة اختلفت في اعداد وأنواع المضادات التي قاومتها جدول (1)، وبالتالي يمكن القول أن هذه النتائج افرزت تسعة انماط مقاومة Resistotypes مختلفة مما يدل على قدرة هذه البكتريا على نشر المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة بين سلالاتها وأن مقاومة المكورات المعوية الطبيعية للعديد من أنواع المضادات الحيوية واكتسابها للمقاومة عن طريق حركة جينات المقاومة الواقعة على البلازميدات والعناصر الجينية القافزة والتبادل الكروموسومي تعد من اهم الاسباب في ظهور سلالات المكورات المعوية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Mundy et al.، 2000). هذه النتائج الخاصة بالمقاومة المتعددة جاءت متفقة مع دراسات أخرى بينت مقاومة المكورات المعوية للعديد من أصناف المضادات الحيوية شائعة الاستخدام (Mengeloglu. 2011 ; Gajan et al ، 2008 ; Xu et al ،2007).

إن معرفة المعلومات الحديثة عن انماط الحساسية للمضادات الحيوية تعد مهمة لغرض التحديد الصحيح والاستخدام المناسب للمضادات الحيوية في العلاج كما أن هناك تزايدا في نسبة الاخفاق في معالجة اصابات جنس المكورات المعوية الذي يعد من اهم مسببات عدوى المستشفيات (Al- Yassery ،2011)، لا سيما وأن سلالات المكورات المعوية المقاومة للعلاجات تسبب معدلات هامة من الامراضية Morbidity والوفيات Mortality للمرضى وخاصة المثبطين مناعيا (Hufnagle et al ،2004.).

المحتوى البلازميدي في عزلات المكورات المعوية المدروسة:

قبل الدخول في دراسة موضوع التحييد البلازميدي خاصة على المستوى الجزيئي كان لابد من معرفة المحتوى البلازميدي للعزلات المنتخبة (6، 7، 4 و3) وهي العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية في نتائج هذه الدراسة جدول (1)، حيث احتوت العزلة رقم 6 على ثلاث حزم بلازميدية وباحجام مختلفة، إذ كان حجم الحزمة الاولى أكبر من (10000 bp.) والثانية ما يقارب (4000 bp.) والثالثة ما يقارب (3500 bp.) أما العزلتين رقم 7 و4 فقد اعطت كل منهما حزمتين بلازميديتين الاولى بحجم اكبر من (10000 bp.) والثانية بحجم يقارب (3000 bp.)، أما العزلة رقم 3 فاظهرت حزمة بلازميدية واحدة فقط وبحجم اكبر من (10000 bp.) صورة (1) ، وتؤكد الدراسات على شيوع أو وفرة البلازميدات في عزلات المكورات المعوية بواقع (1 -6) بلازميد لكل عزلة ومن ضمنها تلك التي تمنح مقاومة للمضادات الحيوية وأن البلازميدات الموجودة في هذه البكتريا تختلف كثيرا في الحجم (تتراوح احجامها بين أقل من 10kb. إلى ما يقارب 400kb. أو أكثر) وهذا الاختلاف قد يعكس مرونة البلازميد مما يجعل الجينات تتحرك بسهولة داخل وخارج تلك البلازميدات (Donelli et al., 2004; Rosvoll،2012).



L : الدليل الحجمي

الصورة (1): المحتوى البلازميدي لعزلات المكورات المعوية المنتخبة

التحييد باستخدام المستخلص النباتي للسماق و الميرامية ودرجات الحرارة :

إن استخدام العوامل المحيدة للبلازميد قد يخلق طريقة جيدة للحد من انتشار مقاومة المضادات بواسطة البلازميدات، وبما أن غالبية المحيدات البلازميدية المعروفة مثل صبغات الاكردين وEthidium bromide و SDS غير مناسبة للتطبيقات العلاجية بسبب طبيعتها السمية والمطفرة، وأن كل عامل من هذه العوامل ذو فعالية محدودة على عدد محدود من أنواع البلازميدات والمضائف لذلك يجري البحث عن عوامل محيدة للبلازميد أكثر فعالية وامنه بنفس الوقت وبعض هذه العوامل موجودة في النباتات (Beg and Ahmad، 2000; Shriram *et al.*، 2010). تم اختيار المستخلص الكحولي لكل من السماق والميرامية كعوامل محيدة لل DNA البلازميدي للعزلات المنتخبة من جنس المكورات المعوية، والجدول (2) يوضح قيم التركيز الادنى المثبط MIC والتراكيز الأقل منه والتي أُستُخدِمَتْ كتراكيز محيدة لكلا المستخلصين إذ كان التركيز المثبط الادنى لمستخلصي السماق والميرامية 3000 و4000 مايكروغرام / سم^3 على التوالي بينما التركيز المحيد كان 2000 مايكروغرام/سم^3 لكلا المستخلصين.

الجدول (2) التراكيز المثبطة الدنيا لكل من مستخلصي السماق والميرامية وتراكيزها المستخدمة في تجارب التحييد.

نوع المستخلص النباتي	التركيز المثبط الادنى (مايكروغرام/ سم^3)	التراكيز المستخدمة في التحييد (مايكروغرام/سم^3)	التركيز الفعال (مايكروغرام/سم^3)
السماق	3000	1000 و2000	2000
الميرامية	4000	2000 و 3000	2000

توضح النتائج في الجدول (3) النسب المئوية لتحييد العزلات المنتخبة ذات المقاومة المتعددة باستخدام مستخلص السماق والميرامية، حيث كانت النسبة المئوية للتحييد متقاربة بين كلا المستخلصين (2 -8%) لمستخلص السماق و(2 -6%) لمستخلص الميرامية، وظهرت اعلى نسبة تحييد في العزلة رقم 6 إذ اعطى مستخلص السماق نسب تحييد مختلفة مع مضادات حيوية مختلفة حيث كانت نسبة التحييد الاعلى (8%) مع المضاد الحيوي TE أما مع المضاد الحيوي AK كانت (6%) والمضاد AM (4%) وظهرت أقل نسبة تحييد(2%) مع المضاد الحيوي NA، أما في العزلتين رقم 4 و 7 فإن نسب التحييد لم تتجاوز (2%) للمضاد الحيوي AM في عزلة رقم 4 والمضاد AK في عزلة رقم 7 باستخدام مستخلص السماق، بينما لم يعطي مستخلص الميرامية تحييد مع هذه العزلات وكذلك لم تظهر أي نسبة للتحييد في العزلة رقم 3 وباستخدام كلا المستخلصين.

توضح النتائج السابقة أن استخدام مستخلصي السماق والميرامية كعوامل محيدة للبلازميد قد أدى إلى ابطال المقاومة لأربعة مضادات حيوية هي TE و AK و AM و NA والتي تشير عدة دراسات إلى أن الجينات المسؤولة عن مقاومة المكورات المعوية لهذه الأنواع الأربعة من المضادات الحيوية على الاغلب تكون جينات بلازميدية (Dunny *et al.* ،*et al.* 1995; Donelli ،2004). أن فقدان مقاومة هذا النوع البكتيري للمضادات الحيوية قد توفر فرصة للاستفادة مجددا منها إذا ما أُستُخدِمَتْ هذه المستخلصات بصورة مشتركة مع هذه المضادات.

الجدول (3) النسب المئوية لتحييد العزلات المنتخبة باستخدام مستخلصي السماق و الميرامية بتركيز 2000 مايكروغرام /سم^3

رقم العزلات	مستخلص السماق							مستخلص الميرامية						
	نوع المضاد الحيوي وتركيزه µg							نوع المضاد الحيوي وتركيزه µg						
	AK (30)	Am (10)	CIP (5)	E (15)	NA (30)	RA (5)	TE (30)	AK (30)	Am (10)	CIP (5)	E (15)	NA (30)	RA (5)	TE (30)
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6	4	S	0	2	0	8	4	2	S	0	4	0	6
7	2	0	S	0	0	0	S	0	0	S	0	0	0	S

S= العزلة حساسة اصلا لذلك المضاد؛ 0 = عدم حدوث تحييد؛ () تركيز المضاد الحيوي

أشارت العديد من البحوث العالمية إلى اهمية المحيدات ذات الاصل النباتي وقد يكون مركب Plumbagin المستخلص من جذور نبات Plumbago zeylanica من اول المحيدات النباتية والذي اثبتت فعاليته في فقدان مقاومة بكتريا E.coli لستة مضادات حيوية مما يشير إلى فقدان بلازميد المقاومة منها (Lakshmi ،et al. 1987 ; Beg and Ahmed، 2000). كما درس Schelz واخرون (2006) الفعالية ضد البلازميدية للزيوت الأساسية وبين أن زيت النعناع Peppermint ثبط تضاعف البلازميد نوع F'lac في بكتريا E. coli فضلا عن زيت نبات الروزماري وزيت نبات

اليوكالبتوس Eucalyptus. وتم وصف محيد بلازميدي جديد مستخلص من بصيلات نبات Dioscorea bulbifera والذي اثبت فعالية تحييد واسعة الطيف تجاه عدد من أنواع البكتريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ومن ضمنها المكورات المعوية المقاومة للفانكوماسين (Shriram et al. 2008).وتشير بعض الدراسات إلى الفرق الواضح في نسب التحييد باستخدام المستخلص النباتي الخام والمكون الفعال في ذلك المستخلص، إذ اعطى المستخلص الخام لرايزومات نبات Alpinia galangal فعالية ضد بلازميدية تجاه عدد من أنواع البكتريا المقاومة وكانت نسبة التحييد 8% للنوع E.faecalis المقاوم للفانكومايسين في حين وصلت نسبة التحييد لهذا النوع إلى 66% عند استخدام المكون الفعال في هذا النبات 1`- acetoxychavicol acetate (Latha et al .،2009)، وبالتالي فإن إجراء دراسات إضافية لتحديد المكونات الفعالة في مستخلصي السماق والميرامية واختبارها في تجارب التحييد قد يزيد نسبة تحييد البلازميدات في هذه البكتريا.

أُستُخدِمَتْ الحرارة 37 °م 48° م كعامل محيد فيزيائي لمقارنته مع قابلية تحييد المستخلصات النباتية المدروسة، حيث اظهرت النتائج عدم حدوث التحييد التلقائي بدرجة حرارة 37 °م في العزلات المنتخبة لجنس المكورات المعوية. بينما لوحظ عند استخدام درجة الحرارة 48 °م لتحييد البلازميدات أن نسب التحييد كانت تتراوح بين (2 -10%) الجدول (4). إذ يلاحظ أن درجة حرارة 48° م اظهرت تأثيرا محيدا واضحا مع العزلة رقم 6 نتج عنه تحييد المضاد الحيوي AK بنسبة(10%) والمضاد الحيوي Am بنسبة (4%)، مما يشير إلى امتلاك هذه العزلة بلازميدات حساسة للحرارة تحمل الجينات المسؤولة عن مقاومة هذه المضادات وأن بلازميداتها قد تكون أقل ثباتية من غيرها من العزلات، أما العزلة رقم 7 فقد كان تأثير هذا العامل ضعيفا عليها و كانت النسبة المئوية للتحييد(2 %) للمضادين AK وAM مما يدل على ثباتية بلازميدات في هذه العزلة وبذلك يصبح تحييدها صعبا (Xu et al.، 2007). ويذكر Kandela واخرون (2011) أن استخدام درجة الحرارة 48 °م كانت الأكفأ في تحييد عزلات المكورات المعوية ويلاحظ في دراستنا أن نسب التحييد باستخدام مستخلصي الميرامية (2 -6%) والسماق (2 -8%) كانت مقاربة لنسب التحييد باستخدام درجة الحرارة 48 °م (2 -10%) مما يدل ايضا على اهمية هذين المستخلصين في التحييد البلازميدي لعزلات المكورات المعوية.

الجدول (4) النسب المئوية لتحييد عزلات المكورات المعوية المنتخبة باستخدام درجة حرارة 48 م° كعامل.

رقم العزلة	نوع المضاد الحيوي وتركيزه (µg)						
	AK (30)	Am (10)	CIP (5)	E (15)	NA (30)	RA (5)	TE (30)
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
6	10	4	S	0	0	0	4
7	2	2	S	0	0	0	S

S= العزلة حساسة اصلا لذلك المضاد؛ 0 = عدم حدوث تحييد؛ () تركيز المضاد الحيوي

تم ترحيل محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلة رقم 6 فقط لكونها العزلة التي حصل فيها تحييد عالٍ نسبيا مقارنة مع بقية العزلات حيث توضح الصورة (2) نتيجة عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA البلازميدي التابع للعزلة رقم 6 المعاملة بكل من مستخلصي السماق والميرامية، فضلا عن درجتي الحرارة (37 °م 48° م) ويلاحظ من الصورة أن المسار Lane الاول من اليسار يمثل الدليل الحجمي والمكون من احجام متدرجة من الـ DNA ابتداءا من 10000bp

وانتهاءا بـ 100bp، أما المسار من اليمين(C) يمثل العزلة رقم 6 بدون معاملة تحييد (Control) إذ يظهر في هذا المسار ثلاث حزم بلازميدية: الحزمة الاولى بحجم اكبر من (10000 bp) بينما الحزمة الثانية والثالثة كانتا حوالي بحجم (4000bp) و (3500bp) على التوالي وهو ما ظهر في هذه العزلة في تجارب التحري عن المحتوى البلازميدي صورة (1) المسار رقم 1 هو للعزلة المعاملة بدرجة حرارة 37 °م إذ يلاحظ ظهور الحزم الثلاثة وعدم حصول التحييد مما يؤكد أن ازالة البلازميدات باستخدام مستخلصي السماق والميرامية كعوامل محيدة صورة (2) لم تكن تلقائية بل بفعل خاصية التحييد البلازميدي التي يمتلكها هذين المستخلصين، أما المسار رقم 2 فيمثل مسار العزلة المعاملة بدرجة حرارة 48 °م، المسارين 3 و 4 يمثلان العزلات المعاملة بمستخلص الميرامية، أما المسارين 5 و 6 تمثل العزلات المعاملة بمستخلص السماق، حيث يلاحظ في هذه المسارات الخمسة (2، 3، 4، 5، 6) ظهور حزمة البلازميد الاولى فقط وبحجم (اكبر من 10000bp) الملاحظ في مسار السيطرة وعدم ظهور الحزمتان الثانية والثالثة (4000bp) و (3500bp) دلالة على فقدانها وحصول التحييد باستخدام هذه المعاملات.

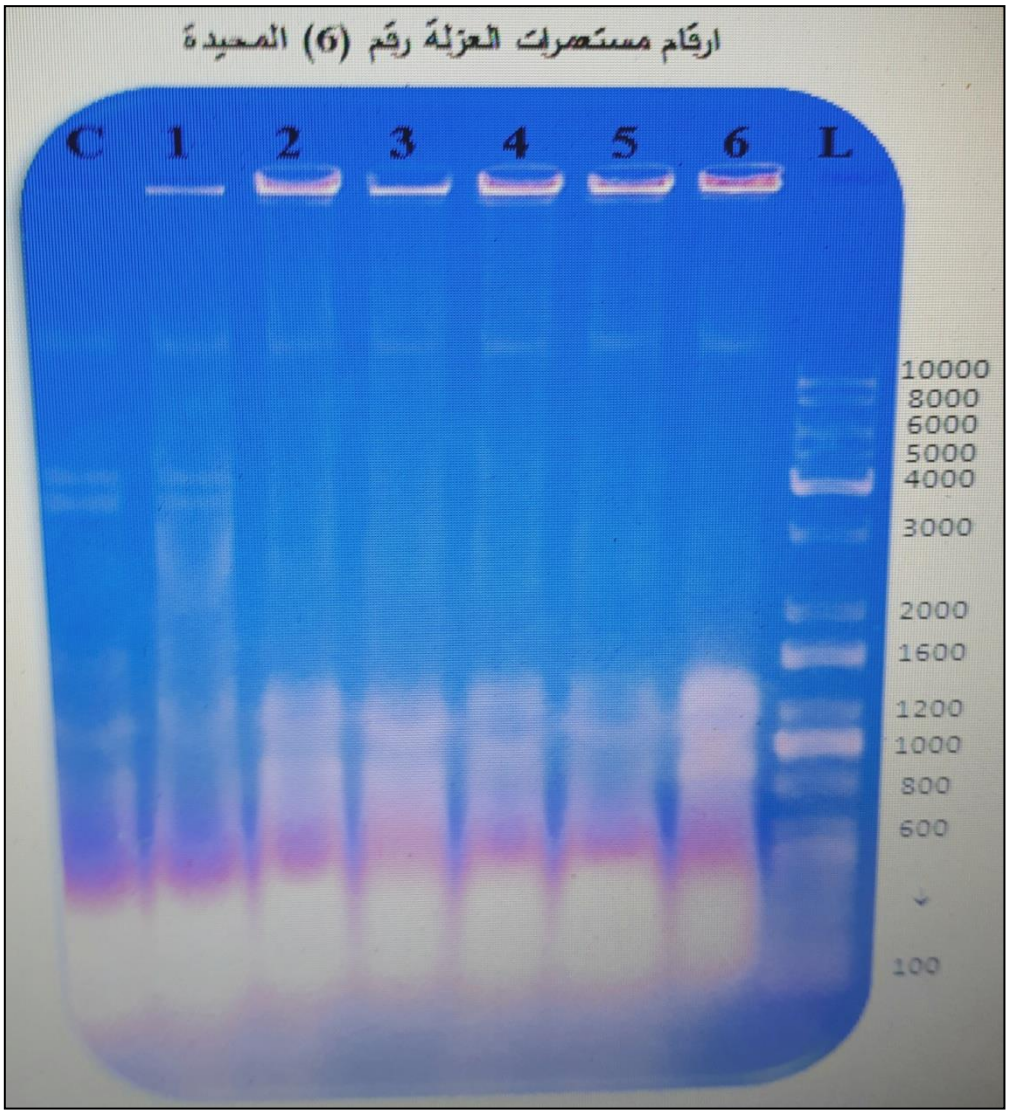
إن أهم آليات ازالة البلازميد هي تعطيل آلية توزيع البلازميدات إلى الخلايا البنوية أو تثبيط تضاعف البلازميد أو تحليل جزء من التركيب السطحي للخلية مما يؤدي إلى تدمير أو الحاق الضرر بالبلازميدات التي تقع قريبة من سطح الخلية أو المرتبطة بالغشاء الخلوي (Kandela et al . 2011)، وقد أشارت العديد من الدراسات السابقة إلى احتواء مستخلصي السماق والميرامية على عدد كبير من المواد الفعالة حيويا (Horiuchi et al. 2007، Kosar et al ; Al- Jubory et al. 2010; Klaus et al. 2008،2007.)، وقد تعزى صفة التحييد البلازميدي لهذين المستخلصين في دراستنا إلى إحدى أو بعض تلك المركبات. وهذه النتائج جاءت لتتوافق مع العديد من الدراسات السابقة والتي اظهرت امكانية ازالة بلازميدات المقاومة باستخدام مستخلصات نباتية مختلفة (Shriram et al. 2008، 2009; Latha et al.، Khader and Muhammed , 2010).

ان اثبات كون مستخلصي السماق والميرامية عوامل محيدة لـ DNA البلازميدي يشير لامتلاكهما مكونات فعالة تساعد على ازالة بلازميدات تحمل جينات مقاومة للمضادات الحيوية والذي تم الاستدلال عليه مظهريا بفقدان صفة المقاومة لاربعة مضادات حيوية (TE، AK، AM، NA) وجزيئيا من خلال فقدان الحزم البلازميدية المستعمرات المحيدة، وأن البلازميدات المزالة وربما تحمل كذلك جينات مسؤولة عن صفات أخرى مثل انتاج عوامل ضراوة مختلفة أو مقاومة المعادن الثقيلة.

ان وجود الجينات المقاومة للمضادات الحيوية على البلازميدات البكتيرية هو العامل الاهم الذي يساعد وبشكل كبير على نقل وانتشار مقاومة المضادات خلال مختلف أنواع وسلالات البكتريا المرضية Beg and Ahmad)، (2000، لذلك توجه العلماء المختصين إلى البحث عن طرائق جديدة تسمح بإمكانية استخدام المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام وجعلها فعالة تجاه البكتريا التي تقاومها وذلك من خلال دراسة العديد من العوامل المحيدة التي تزيل البلازميدات المسؤولة عن مقاومة البكتريا لهذه المضادات وأن اهمية التحييد تكمن ليس فقط في إزالة البلازميد ولكن في إمكانية استخدام المضاد غير الفعال وجعله فعال بحيث يقضي على البكتريا التي قاومته وهذا ما يطلق عليه الان بالمعالجة العكسية Reversible treatment (.2008، Shriram et al).

نستنتج من خلال نتائج الدراسة الحالية قدرة مستخلصات النباتات المدروسة (الميرامية والسماق) في تحييد أو إزالة البلازميدات من عزلات بكتريا المكورات المعوية وجعلها حساسة لمضادات حيوية كانت مقاومة لها قبل المعاملة بهذه المستخلصات، مما يفتح الطريق أمام امكانية إعادة استخدام المضادات الحيوية غير الفعالة بالاشتراك مع هذه المستخلصات أو المكونات الفعالة فيها، ومن المؤكد أن هناك حاجة مستمرة إلى دراسات إضافية سواء لاستخلاص المكونات الأساسية المسؤولة عن الفعالية المضادة للبلازميد في هذه المستخلصات أو اختبار مستخلصات

نباتات أخرى في قدرتها على التحييد البلازميدي في أنواع أخرى من الجراثيم غير المكورات المعوية، وبالتالي المساهمة في وضع الحلول الممكنة تجاه التحدي الصحي الخطير المتمثل بوجود وتطور مشكلة مقاومة البكتريا المتعددة للعلاجات ومنها المضادات الحيوية.



L: الدليل الحجمي؛ C: عزلة السيطرة

الصورة (2) الفقدان البلازميدي بتأثيركل من مستخلصي الميرامية والسماق ودرجات الحرارة

المصادر

- Aabo ،S.; Olsen ،J.E.; Threlfall ،E.J. and Brown ،D.J. (1995). Characterization of non- virulence plasmid with homology to the virulence plasmid of Salmonella Dublin. Res. Microbiol. ،140:751- 759.
- Al- Dorri ،Z.; Hill ،R.L.R. and Casewell ،M.W. (2001). Use of 'Miniprep' for rapid extraction of plasmids from vancomycin- and gentamicin- resistant Enterococcu faecium. World Journal of Microbiology of Biotechnology ،17:517- 521.

- Al- Jarousha ،A.M.K.; Saed ،A.M. and Afifi ،H. (2008). Prevalence of multidrug resistant enterococci in nosocomial infection in Gaza Strip. J. Al- Aqsa Univ. ،12: 15- 24.
- Al- Jubory ،S.Y.O.; Salah ،S.S. and Al- Saltany ،A.A.M. (2010). Antimicrobial study of active constituents of Rhus coriaria. Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences ،2(1): 19- 26.
- Al- Yassery ،K.A.H. (2011). Study of antibiotic susceptibility and virulence determination among Enterococcus faecalis isolated from patients with significant bacteriuria in Najaf. Ph.D. Theisi ، University of Kufa ،Iraq.
- Arias ،C.A.; Contreras ،G.A. and Murray ،B.E. (2010). Management of multidrug- resistant enterococcal infections. Clin. Microbiol. Infect. ،16:555- 562.
- Beg ،A.Z. and Ahmed ،I. (2000). Effect of Plumbago zeylanica extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin. World Journal of Microbiology & Biotechnology ، 16:841- 844.
- de- Niederhausern ،S.; Bondi ،M.; Messi ،P.; Iseppi ،R.; Sabia ،C.; Manicardi ،G. and Anacarso ،I. (2011).Vancomycin- resistance transferability from VanA enterococci to Staphylococcus aureus. Curr. Microbiol. ،62(5):1363- 1367.
- Diarra ،M.S.; Rempel ،H.; Champagne ،J.; Masson ،L.; Pritchard ،J. and Topp ،E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence gene in Enterococcus spp. and characterization of isolates from broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 76(24):8033- 8043.
- Donelli ،G.; Paoletti ،C.; Baldassarri ،L.; Guaglianone ،E.; DiRosa ،R.; Magi ،G.; Spinani ،C. and Facinelli ،B. (2004). Sex pheromone response ،clumping and slime production in enterococcual strains isolated from occluded biliary stents. J. Clin. Microbiol. ،42(8): 3419- 3427.
- Dunny ،G.M.; Leonard ،B.A.B. and Hedberg ،P.J. (1995). Pheromone- inducible conjugation in Enterocuccus faecalis: interbacterial and host- parasite chemical communication. Journal of Bacteriology ،177(4): 871- 876.
- Gajan ،E.B.; Abshov ،R.; Aghazadeh ،M.; Eslami ،H.; Oskouei ،S.G. and Mohamodnejad ،D. (2008). Vancomycin- resistant Enterococcus faecalis from a waste water treatment plant in Tabriz ،Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences ،11(20)2443- 2446.
- Horiuchi ،K.; Shiota ،S.; Kuroda ،T.; Hatano ،T.; Yoshida ،T. and Tsuchiya ،T. (2007). Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from Salvia officinalis. Biol. Pharm. Bull. ،30(2): 287- 290.
- Hufnagel ،M.; Hancock ،L.E.; Koch ،S.; Theilacker ،C.; Gilmore ،M.S. and Huebner ،J. (2004). Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in Enterococcus faecalis. J. Clin. Microbiol. ،42(6):2548- 2557.
- Kabiru ،O. A.; Christopher ،O. F.; Bamidele ،A. I. and Akeeb ،O. O.(2017).Activities of Three Nigerian Medicinal Plants Against Plasmid- Carrying Enteric Bacterial Pathogens. EC Microbiology 5: 10- 21.

- Kandela ،N.; Aziz ،G. and Khankah ،H. (2011). Agenetic study on enterocin- production from Enterococcus faecalis isolates from different clinical sources. First international Conference of genetic engineering ،Baghdad University- Iraq.
- Khader ،A.K. and Muhammed ،S.A. (2010). Potential of aqueous and alcohol extracts of Quercus infectoria ،Linus asitatissium and Cinnamommum zeylanicium as antimicrobials and curing of antibiotic resistance in E.coli. Current Research Journal of Biology Sciences ،2(5):333- 337.
- Klaus ،A.S.; Beatovic ،D.V.; Niksic ،M.P.; Jelacic ،S.C.; Nedovic ،V.K. and Petrovic ،T.S. (2008). Influence of ethereal oils extracted from Lamiaceae family plant on some pathogenic microorganism. Proc. Nat. Sci. ،115 ،115:65- 74.
- Kosar ،M.; Bozan ،B.; Temelli ،F. and Baser ،K.H.C. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (Rhus coriaria L.). Food Chemistry ،103: 952- 959.
- Lakshmi ،V.V.; Padma ،S. and Polasa ،H. (1987). Elimination of multdrug- resistant plasmid in bacteria by plumbagin ،acompound derived from a plant. Current Microbiology ،16:159- 161.
- Latha ،C.; Shriram ،V.D.; Jahagirdar ،S.S.; Dhakephalkar ،P.K. and Rojatkar ،S.R. (2009). Antilasmid activity of 1- acetoxychavicol acetale from Alpinia galangal against multi- drug resistant bacteria. Journal of Ethnopharmacology ،123:522- 525.
- Mengeloglu ،F.Z.; Cakir ،D. and Terzi ،H.A. (2011). Comparison of resistance in isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium ،Journal of Microbiology and Infections Diseases ، 1(1):10- 13.
- Motamedi ،H.; Darabpour ،E.; Gholipour ،M. and Nejad ،S.M.S. (2010). Antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of Plantago ovata and Oliveria decumbens endemic in Iran against some Pathogenic bacteria. International Journal of Pharmacology ،6(2): 117- 122.
- Mundy ،L.M.; Sahm ،D.F. and Gilmore ،M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. ،13(4):513- 522.
- Rodrigues ،J.; Poeta ،P.; Martins ،A. and Costa ،D. (2002). The importance of pets as reservours of resistant Enterococcus strains ،with special reference to vancomycin. Journal of Veterinary Medicine ، 49(6):278- 80.
- Rosvoll ،T.C.S. (2012). Plasmids resistance and hospital adaptation in Enterococci- PH.D. Thesis ، Univ. Tromso ،UIT.
- Schelz ،Z.; Molnar ،J. and Hohmann ،J. and Hohmann ،J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. Fitoterapia ،77:279- 285.
- Shriram ،V.; Jahagirdar ،S.; Latha ،C.; Kumar ،V.; Dhakephalkar ،P.; Rojatkaar ،S. and Shitole ،M.G. (2010). Antibacterial & antiplasmid activites of Helicteres isora L.. Indian J. Med. Res. ،94- 99.
- Shriram ،V.; Jahagirdar ،S.; Latha ،C.; Kumar ،V.; Puranik ،V.; Rojatkar ،S.; Dhakephalkar ،P.K. and Shitole ،M.G. (2008). A potential plasmid- curing agent ،8- epidioshulbin eacetate ،from Dioscorea

bulbifera L. against multidrug- resistant bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents ، 32:405- 410.

- Vandepitte ،J.; Enbaek ،K.; Rohner ،P.; Poit ،P. and Heuck ،C.C. (2003). Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization ،Geneva.
- Xu ،J.; Gallert ،C. and Winter ،J. (2007). Multiple antibiotic resistance of Enterococcus isolated from raw or sand- fitered sewage. Appl. Microbiol. Biotechnol. ،74:493- 500.

Anti- plasmid effect of some plant extracts against multidrug resistant Enterococci.

Abstract: Multiple drug resistance (MDR) is one of the most important global health challenges requiring constant research. Most of the genetic determinants responsible for this resistance are located on plasmids. The present research was carried out to investigate the anti- plasmid activity of alcoholic extracts of Sumach (*Rhus Coriaria*) and Sage (*Salvia officinalis*) against antibiotics resistant Enterococci. Antibiotics sensitivity test results showed that all these bacteria isolates possess different types of multidrug resistance had reached up to nine out of fourteen antibiotics ،All isolates showed absolute resistance (100%) to the Amikacin and Naldixic acid. Results of anti- plasmid activity investigation of Sumach and Sage alcoholic extracts against Enterococci selected isolates ،was demonstrated the plasmid curing with a concentration of (2000 µg / cm^3) ،by the loss of antibiotic resistance characteristic toward (Amikacin ،Ampicillin ،acid Naldixic and Tetracycline) and molecular loss of two plasmids (Size 4000 bp & 3500 bp) ،which demonstrating the presence of resistance genes of above- mentioned antibiotics on the cured plasmids. Therefore ،this result open the way to possibility of using these two plants after additional studies to treatment the problem of drugs resistance in Enterococci and other pathogenic bacteria.

Keywords: Plasmid ،Plant extracts ،Enterococci ،MDR.