المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (11) العدد (2)
لسنة 2019

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc11.2.2019.(11)

التأثير المثبط لمستخلصات الزعتر على السموم المعوية المنتجة من جرثومة المكورات العنقودية الذهبية

ايمان جواد كاظم[1]، عادل عبيد حسوني[2]، اقبال حربي كاظم[3]

[1]استاذ مساعد دكتوره، قسم المقاومة الاحيائية، الكلية التقنية المسيب، جامعة الفرات الاوسط التقنية، بابل، العراق imanprof9@gmail.com

[2]استاذ مساعد دكتوره، قسم المقاومة الاحيائية، الكلية التقنية المسيب، جامعة الفرات الاوسط التقنية، بابل، العراق dr.adil_aa@yahoo.com

[3]فني، قسم المقاومة الاحيائية،الكلية التقنية المسيب، جامعة الفرات الاوسط التقنية، بابل، العراق akbaal44@yahoo.com

الاستلام 11/ 11/ 2018، القبول 15/ 1/ 2019، النشر 31/ 12/ 2019

هذا العمل تحت سياسية ترخيص من نوع CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الخلاصة

تم الحصول على ثمان عزلات جرثومية من 185 عينة بول، أي بنسبة عزل 4.3% وشخصت على انها تعود للنوع *S. aureus*، وقد اظهرت خمسة عزلات جرثومية قابليتها في انتاج السموم، أي بنسبة 62.5%، واظهرت غالبية العزلات الجرثومية قابليتها في انتاج نوعين من السموم على الاقل، وتم تقييم انتاج السموم المعوية بوجود المستخلصات الخام (مائية وكحولية) لعشبة الزعتر باستخدام عدة Reversed passive latex agglutination kit (SET-RPLA)، وقد وجد ان هذه المستخلصات اختزلت انتاج السموم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، كما لوحظ تثبيط كلي لانتاج السم المعوي C وعند التركيز المبثط الادنى 400 مايكروغرام/ مللتر، بينما لوحظ تثبيط كلي للسموم المعوية A وB وD عند التركيز المثبط الادنى 800 مايكروغرام/ مللتر، وعليه تظهر النتائج بان المستخلصات المائية والكحولية من عشبة الزعتر لها القابلية في اختزال انتاج السموم المعوية من جرثومة *S. aureus*.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية الذهبية، السموم المعوية، الزعتر.

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc11.2.2019.(11)

INHIBITORY EFFECT OF THYMOL EXTRACTS ON ENTEROTOXINS PRODUCTION BY *Staphylococcus aureus*.

Iman Jawad Kadhim [1], Adil Abead Hassoni[2], Akbal Harby Kadhim[3]

[1]Assistant Prof. Dr., Biological Control Techniques Department, Technical Collage, Al-Musayib, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq imanprof9@gmail.com

[2]Assistant Prof. Dr., Biological Control Techniques Department, Technical Collage, Al-Musayib, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq dr.adil_aa@yahoo.com

[3]Technical, Biological Control Techniques Department, Technical Collage, Al-Musayib, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq akbaal44@yahoo.com

Received 11/ 11/ 2018, Accepted 15/ 1/ 2019, Published 31/ 12/ 2019

This work is licensed under a CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

ABSTRACT

One hundred and eighty five urine samples were collected eight isolates (4.3%) were obtained and diagnosed as *Staphylococcus aureus*. Among 8 isolates, 5 (62.5%) *S. aureus* isolates were found to be enterotoxigenic, most of isolates produced at least two types of *Staphylococcal enterotoxins* (SEs). The production of enterotoxins in the presence or absence of Thymol extracts (aqueous and alcoholic) were estimated using a reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit. The extracts reduced enterotoxin production

compared with the control. Enterotoxin inhibition was observed for enterotoxin C production at minimal inhibitory concentrations (MIC) at 400 µg/ml, whereas production of enterotoxins A, B, and D were totally eliminated at (MIC) 800 µg/ml. The results show that the aqueous and alcoholic extracts from the leaves of Thymol decreased the production of SEs by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, Thymol .

المقدمة INTRODUCTION

تعد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* احد انواع البكتريا الممرضة للانسان، وتكون مغمدة encapsulated مع مقاومتها لعملية البلعمة، فضلا عن قابليتها على اجتياح والبقاء حية ضمن مدى واسع من الخلايا اللبنية **(Carlos *et al*., 2010)**، وتسبب هذه الجرثومة كل الاصابات المكتسبة بالبيئة والمكتسبة بالمستشفى فضلا عن اقترانها بنسبة مهمة من الوفيات والامراضية، ويسبب هذا الممرض مدى واسع من الامراض السريرية مثل الافات الجلدية والانسجة الرخوة والاسهال واصابات الجهاز البولي فضلا عن الاصابات المميتة مثل التهاب نقي العظم والتهاب شغاف القلب وذات الرئة وانتان الدم **(Gad *et al*., 2009; Qiu *et al*., 2010; Saify *et al*., 2013)**.

تعد جرثومة *S. aureus* ممرضة عند عزلها من البول ويجب الاخذ بنظر الاعتبار عند عزلها من عينات المرضى بان هناك خطورة عالية بان تسبب هذه البكتريا تجرثم الدم **(Afzal *et al*., 2017)**، فمن المفترض عندما تصيب هذه الجرثومة الجهاز البولي انها تعتبر ممرض حقيقي، وعليه يمكن ان ينتج تجرثم الدم بالمكورات نتيجة استيطانها للجهاز البولي. ومن المسلم به ان تجرثم البول بها يحدث خلال استخدام بعض الادوات مثل قسطرة الاحليل وعمليات التلقيح الصناعي للجهاز البولي التناسلي **(Chihara *et al*., 2010)**، وتعتمد اغلب الامراض الرئيسة التي تسببها هذه الجرثومة على قابلية العزلات في البقاء حية وتضاعفها تحت مختلف الظروف وانتاجها للعديد من المركبات الخارج خلوية، ومن بين اهم السموم والانزيمات الخارج خلوية التي تنتجها هي haemolysins وnuclease وcoagulase وlipase و toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) وprotein A والسموم المعوية staphylococcal enterotoxins (SEs) **(Nostro *et al*., 2002; Qiu *et al*., 2010; Safaei *et al*., 2015)**.

يحتوي جنس الزعتر *Thyme* (*Thymus vulgaris*) على 350 نوع النباتات العشبية العطرية دائمة الخضرة فضلا عن انها شجيرات تكون على ارتفاع 40 سم، وجميعها تعود لعائلة الـ Lamiaceae **(Yazdi *et al*., 2013; Gonçalves *et al*., 2013)**، ويعتبر هذا النبات من الشجيرات دائمة الخضرة ذات رائحة عطرة، وينمو في مناطق عديدة من العالم (منطقة البحر الابيض المتوسط، العراق، اسيا، جنوب اوربا، شمال اقريقيا) **(Salih, 2012; Flores *et al*., 2018)**، وهناك العديد من التقارير المسبقة عن فعاليته كمضاد للاكسدة وتعزيز عمل الجهاز المناعي ومعالجة الالتهابات فضلا عن فعالية زيوته العطرية كمضاد للميكروبات، حيث تم التحري عن فعاليته ضد عدد من الاحياء المجهرية وباستخدام طرق مختلفة

(Fratini *et al*., 2014; Wei *et al*., 2014)، اذ تكون الزيوت العطرية له غنية بالمركبات الكيميائية مثل thymol وcarvacrol وγ-terpipene التي تعد من المركبات الفينولية الرئيسة المسوؤلة عن الصفات العلاجية للزعتر لما لها من تاثير قوي كمضادات للجراثيم **(Salih, 2012)**، لذا فقد هدف البحث الى تحديد معدل انتشار وسمية العزلات التابعة لجرثومة *S. aureus* المعزولة من اصابات الجهاز البولي في محافظة بابل والتحري عن تاثير التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات المائية والكحولية المحضرة من اوراق الزعتر في انتاج انواع من السموم المعوية SEs (A-D) المنتجة من هذه الجرثومة.

المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHODS

العزلات الجرثومية bacterial isolates

اجريت هذه الدراسة في الكلية التقنية/ المسيب للفترة من كانون الثاني الى ايار لسنة 2018، وتم خلالها عزل 8 عزلات جرثومية من *S. aureus* من عينات البول لـ 185 مريض كانوا يعانون من اصابات في الجهاز البولي من مستشفيات متعددة من مدينة بابل، وتم التخطيط من هذه العينات على اسطح الاوساط الزرعية mannitol salt agar وmacconkey agar وblood agar وثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، وشخصت بالاعتماد على الصفات الكيميائية الحيوية والمظهرية **(Caplin *et al*., 2009; Saify *et al*., 2013)** التي تضمنت صبغة غرام وتفاعل الكاتاليز وانتاج الحامض من وسط mannitol salt agar والتخمر اللاهوائي للمانيتول وانتاج الاسيتون وcoagulase test فضلا عن تشخيص العزلات باستخدام API Staph system، وتم المحافظة على العزلات الجرثومية باعادة زرعها على وسط agar slants، وجرى تنشيط جميع العزلات الجرثومية بواسطة نقلها من وسط brain heart infusion (BHI) الى وسط nutrient broth وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، ثم حفظت العزلات الجرثومية في وسط trypticase soy broth (TSB) المضاف له الكليسيرول بنسبة 15% والخزن عند درجة حرارة -20م **(Gad *et al*., 2009)**.

الكشف عن انتاج السموم المعوية Assay of enterotoxins production

تم الكشف عن انتاج السموم المعوية (A وB وC وD) بوجود او غياب مستخلصات الزعتر بواسطة اختبار الـ reversed passive latex agglutination باستخدام الـ SET-RPLA kit، والتي تعتبر طريقة جيدة عند تعامل مع طافي المزروع الجرثومي، ففي هذا الاختبار، تكون جزيئات الـ latex حساسة مع اضداد للسموم المعوية المنتجة من الجرثومة، وان حدوث التلازن يشير الى وجود السموم المعوية، وتم حضن جميع العزلات الجرثومية *S. aureus* المزروعة على وسط الـ TSB في حاضنة هزازة بظروف هوائية عند درجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة، ثم نبذت مركزيا عند سرعة 900 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4م، وتم ترشيح الرائق باستخدام مرشح غشائي ذي حجم 0.45 مايكرومتر باستخدام صفيحة الـ microtitre والتي تكون فيها كل صف مكون من 8 حفر، واستخدمت 5 صفوف لكل عزلة جرثومية، ثم وزع محلول مخفف بحجم 25 مايكرولتر لكل حفرة من 5 صفوف، وتم اضافة المزروع الجرثومي بحجم 25 مايكرولتر لكل اول حفرة من الـ 5 صفوف، ثم اجراء التخافيف المضاعفة المزروع الجرثومي لكل الـ 5 صفوف، وتم ايقاف التخفيف عند الحفرة السابعة لكل الصفوف بحيث تحتوي الحفرة الاخيرة الثامنة لكل صف على محلول مخفف فقط، ثم اضيفت جزيئات الـ latex حساسة مع اضداد للسموم المعوية (A وB وC وD) المجهزة مع العدة الى كل حفرة وتم مزج المحتويات، ثم حضن جميع الاطباق مع السيطرة الموجبة والسالبة لكل عينة لمدة 20-24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة، وجرى تصنيف تفاعلات التلازن على انها موجبة بالاعتماد على تعليمات الجهة المصنعة لعدة الفحص، فعند ظهور تلازن كامل يشار له بـ (+++) او تلازن غير كامل مع ملاحظة كرية او حبيبة صغيرة في مركز جزيئات الـ latex المتلازنة (++،+)، وتم اعتبار التفاعلات سالبة في حالة غياب او عدم وجود تلازن (-)، وتحسب عيارية السموم المعوية عند اخر تخفيف اعطى نتيجة موجبة لتفاعل التلازن **(Nostro *et al*., 2002)**.

تحضير المستخلصات الخام للزعتر Preparation of thymol crude extract

حضرت المستخلصات من اوراق الزعتر بالاعتماد على طريقة الباحث **Behnia *et al*. (2008)**، اذ جمعت اوراق الزعتر ذات النوعية الجيدة من الاسواق المحلية وتم التأكد من النوع والتشخيص من قبل استاذ مختص في تصنيف النبات (د. عبد الكريم البرماني / كلية العلوم جامعة بابل) بالاعتماد على اسس التصنيف للنبات، وغسلت المادة النباتية (اوراق الزعتر) بواسطة الماء لغرض تنظيفها من الاتربة والاوساخ العالقة بها، وبعد ان تم تجفيفها طحنت بالمطحنة الى مسحوق ناعم وتم الاستخلاص بالكحول الاثيلي بتركيز 95% فضلا عن الاستخلاص بالماء المقطر بطريقة النقع، اذ نقع 100غم من النبات المطحون في 500 مللتر من المذيب (الماء المقطر للمستخلص المائي والايثانول للمستخلص الكحولي) عند درجة حرارة 25م لمدة 7 ايام، وتم ترشيح المستخلصات من خلال قمع بخنر المبخر Buchner funnel evaporator

عند درجة حرارة 40م وذلك لتسهيل اجراء عملية التجفيد فيما بعد، وفي النهاية المستخلصات المركزة التي تم الحصول عليها من عملية التجفيد عند درجة حرارة -50م لمدة 24 ساعة تم حفظها عند درجة حرارة -20م، واعيد اذابة المستخلصات في المذيبات قبل كل تجربة.

تحضير المحلول الخزين للمستخلصات Preparation of stock solutions

اذيب 100 ملغم/ مللتر من كل مستخلص باستخدام المذيبات، وعقمت من خلال استخدام مرشح غشائي ذات حجم مسام 0.22 مايكرومتر، وحفظت كمحلول خزين، ثم حضرت التراكيز التالية وعلى مكررين 100 و200 و400 و800 مايكروغرام/ مللتر، وتم تحضير المحاليل الخزينة بتراكيزها المختلفة باستخدام الـ dimethyl sulphoxide (DMSO) **(Behnia *et al*., 2008)**.

تحضير العالق الجرثومي Preparation of microbial suspension

حفظ المزروع الخزين لكل العزلات الجرثومية *S. aureus* المحفوظة على وسط الاكار المغذي المائل في الثلاجة عند درجة حرارة 7±1م، وتم الحصول على المزروع الجرثومي المستخدم في تجارب الدراسة عن طريق زرع الجرثومة على وسط الاكار المغذي المائل عند درجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة، ونقلت مجموعة من المستعمرات من وسط الاكار المغذي الى انبوبة اختبار تحتوي على محلول الملحي المعقم بتركيز (0.85غم/ 100 مللتر) للحصول على تركيز نهائي تقريباً 108 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر وتم تعديل كثافة اللقاح وفقا لعكورة انبوب مكفارلاند القياسي 0.5، وبلغ التركيز النهائي للقاح المستخدم للكشف عن التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) تقريبا 1.5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر **(Souza *et al*., 2010)**.

تحديد التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات الخام

Determination of the minimum inhibitory concentration (mic) of the crude extracts

استخدمت صفائح ذات 96 حفرة معقمة لتحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) بواسطة اختبار التخفيف المتسلسل للمرق، ففي هذه الطريقة تم اضافة 75 مايكرولتر من عالق الجرثومة المحضر بتركيز 1.5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر الى الحفر التي تحتوي 75 مايكرولتر من المستخلصات الخام بتراكيز مختلفة 100 الى 800 مايكروغرام/ مللتر محضرة في وسط muller-hinton، ثم وزع العالق الجرثومي مع الوسط الزرعي كمجموعة سيطرة الى صف واحد وتم اضافة المستخلصات الخام بتراكيزها المختلفة الى عمود واحد، وحضنت الصفائح الصغيرة عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة **(Abachi *et al*., 2013)**، بعدها اخذ الطافي وخضع لاختبار تحديد السموم المعوية بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل الشركة المصنعة، وتم التعبير عن نتائج انتاج السموم المعوية الموجبة بالرمز (+) والسالبة بالرمز (-)، وتم تعيين اقل تركيز للمستخلصات الخام الذي ادى الى تثبيط كلي لانتاج السموم المعوية من قبل الجرثومة كتراكيز مثبطة دنيا، فيما اعتبرت الانابيب التي بدون المستخلصات الخام كمجموعة سيطرة موجبة **(Souza *et al*., 2010)**.

التحليل الاحصائي Statistical analysis

كل التجارب (تحديد التراكيز المثبطة الدنيا وتجارب النمو وانتاج السموم المعوية) تم عملها بواقع ثلاث مكررات لكل تجربة، وتم التعبير عن نتائج التجارب بشكل (المعدل الحاسبي±الانحراف المعياري)، واستخدم اقل فرق معنوي للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة باستعمال البرنامج الاحصائي الشامل (SPSS) عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$).

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

عزل وتشخيص العزلات الجرثومية Isolation and identification of bacterial isolates

تم الحصول على 8 عزلات جرثومية تعود للنوع *S. aureus* من 185 عينة بول أي ان نسبة عزل الجرثومة هو(4.3 %)، وشخصت جميع العزلات بالاعتماد على الاختبارات الكيميائية الحيوية التقليدية الموضحة في (الجدول، 1)، واخضعت جميع العزلات للتشخيص التاكيدي باستخدام نظام API Staph.

تعد *S. aureus* جرثومة ممرضة شائعة في البيئة وفي المستشفيات، وان لها اهمية كممرض وجرثومة مسببة الوفيات ولكنها غير شائعة كممرض الجهاز البولي **(Chihara *et al*., 2010)**، ومع ذلك تعتبر ممرض اولي للجهاز البولي بين المرضى **(Afzal *et al*., 2017)**، واشار الباحث **Gad *et al*. (2009)** الى نتائج متقاربة حيث عزل جرثومة *S. aureus* من مرضى اصابات الجهاز البولي بنسبة 6.2 %، كذلك الباحث **Moussa *et al*. (2008)** قد حصل على 100 عزلة جرثومية تعود للنوع *S. aureus* من مرضى اصابات الجهاز البولي خلال مدة اربعة اشهر، فضلا عن الباحث **Afzal *et al*. (2017)** الذي اشار الى ان نسبة عزل جرثومة *S. aureus* من عينات البول هي فقط 4%، ولا تتفق النتائج المنحصل عليها مع دراسة اخرى للباحث **Chihara *et al*. (2010)** الذي اشار الى ان نسبة عزل جرثومة *S. aureus* من البول هي قليلة ولا تتجاوز 1%، كما اشار الباحث **Souza *et al*. (2010)** الى ان نسبة عزل جرثومة *S. aureus* من مراكز متعددة في المملكة المتحدة هو فقط 0.5%، بينما اشار الباحث **Goldstein (2000)** الى ان نسبة عزل جرثومة *S. aureus* من عينات البول من المختبرات في فرنسا هو فقط 1.3%.

جدول (1): التوصيف الكيميائي الحيوي لعزلات *S. aureus* المعزولة من عينات البول.

الاختبار	النتيجة
انزيم الاوكسيديز	---
انزيم الكاتالايز	+
انزيم الكوئكيليز	+
انزيم اليوريز	+
انتاج الحامض من السكريات	
الكلوكوز	+
اللاكتوز	+
المانيتول	+
المالتوز	+
السكروز	+
انتاج الاندول	---
احمر المثيل	+
فوكس بروسكاور	+
استهلاك السترات	----

الكشف عن انتاج السموم المعوية Staphylococcal enterotoxins (SEs) assay

تم التحري عن قابلية جميع العزلات الجرثومية على انتاج السموم المعوية (SEA وseb وSEC وSED) باستخدام طريقة الـ reversed passive latex agglutination (RPLA)، واظهرت النتائج ان خمسة عزلات فقط من اصل ثمانية هي ذات سمية (أي لها القابلية على انتاج السموم المعوية) أي بنسبة 62.5 %، ثلاثة من هذه العزلات ذات السمية لها القابلية على انتاج نوعين من السموم المعوية، وواحدة من هذه العزلات ذات السمية لها القابلية على انتاج ثلاث

انواع من السموم المعوية، بينما اظهرت عزلة واحدة من هذه العزلات ذات السمية لقابليتها على انتاج نوع واحد فقط من السموم المعوية كما موضح في (الجدول 2)، وبينت النتائج انه عزلتين فقط بنسبة 25% لها القابلية على انتاج السم المعوي A وهما العزلتين الجرثوميتين E1 وE6، وهناك عزلتين فقط بنسبة 25% لها القابلية على انتاج السم المعوي B وهما العزلتين الجرثوميتين E3 وE4، وايضا عزلتين فقط بنسبة 25% لها القابلية على انتاج السم المعوي D وهما العزلتين الجرثوميتين E4 وE6، بينما توجد اربع عزلات جرثومية بنسبة 50% لها القابلية على انتاج السم المعوي C، ولوحظ ان العزلة الجرثومية E1 لها القابلية على انتاج كلا السمين المعويين A وC، بينما العزلة الجرثومية E3 لها القابلية على انتاج كلا السمين المعويين B وC، كذلك العزلة الجرثومية E4 لها القابلية على انتاج السمين المعويين B وD، بينما العزلة الجرثومية E1 لها القابلية على انتاج كلا السمين المعويين A وC، كذلك العزلة الجرثومية E4 لها القابلية على انتاج كلا السمين المعويين B وD، بينما العزلة الجرثومية E6 لها القابلية على انتاج كل من السموم المعوية A وC وD، اما العزلة الجرثومية E8 لها القابلية على انتاج السم المعوي C فقط.

يعد استخدام طريقة الـ SET-RPLA kit من الطرق المختبرية الاكثر شيوعا في تحديد السموم المعوية من قبل العزلات الجرثومية، فهو مصمم لتحديد فقط السموم المعوية (SEA وSEB وSEC وSED) **(Barrett *et al*., 1999; Moussa *et al*., 2008)**، في هذه الدراسة كانت نسبة العزلات لجرثومة *S. aureus* التي لها القابلية في انتاج السموم المعوية هي 62.5%، واظهرت دراسات اخرى **Imanifoolade *et al*. (2007); Sina *et al*.(2013)** ان عزلات جرثومة *S. aureus* المعزولة من الاصابات الجلدية كان لها القابلية في انتاج السموم المعوية بنسبة 45%، واشار الباحث **Solano *et al*. (2013)** الى ان عزلات جرثومة *S. aureus* المعزولة من عينات الاستفراغ (تقيأ) تكون ذات سمية بنسبة 19.4%، كما بين **Al-Jumaily *et al*. (2014)** ان عزلات جرثومة *S. aureus* المعزولة من التهاب الضرع في الابقار كانت لها القابلية في انتاج السموم المعوية بنسبة 50.8%، ولوحظ في هذه الدراسة ان اغلب العزلات الجرثومية كانت لها القابلية على انتاج السم المعوي C، وهذه النتائج تتفق مع نتائج الباحث **Udo *et al*. (2006)** حيث اظهر ان 23.8% من عزلات جرثومة *S. aureus* المعزولة من الدم والبول كانت لها القابلية في انتاج السم المعوي C، بينما لا تتفق مع نتائج نفس الدراسة حيث اشار الى ان جميع عزلات جرثومة *S. aureus* ليس لها القابلية في انتاج السموم المعوية A وB وD، وقد يعود سبب هذه الاختلافات في النتائج الى حساسية الطريقة المستخدمة للكشف عن السموم المعوية.

ان تنوع العزلات الجرثومية في قابليتها على انتاج السموم المعوية يعتمد على مصدر العزل، اذ يلعب المضيف دور مهم في المساعدة على التكيف بين الجرثومة والبيئة المحيطة بها **(Imanifooladi *et al*., 2010)**، اذ وجد ان اغلب العزلات الجرثومية المعزولة من الحليب والتهاب الضرع في الابقار تنتج السم المعوي A **(Moon *et al*., 2007; Rahimi & Alian, 2013; Al-Jumaily *et al*., 2014)**، بينما العزلات الجرثومية المعزولة من منتجات الالبان تنتج السم المعوي C **(Rahimi, 2013)**، اما العزلات الجرثومية المعزولة من اصابات الجلد والجروح تنتج السم المعوي B **(Imanifoolade *et al*., 2007; Sina *et al*., 2013)**.

جدول (2): انتاج السموم المعوية من عزلات جرثومة *S. aureus* المعزولة من عينات البول باستخدام طريقة RPLA.

العزلات الجرثومية	السموم المعوية			
	A	B	C	D
E1	+	−	+	−
E2	−	−	−	−
E3	−	+	+	−
E4	−	+	−	+
E5	−	−	−	−
E6	+	−	+	+
E7	−	−	−	−
E8	−	−	+	−

تاثير المستخلصات الخام للزعتر على انتاج السموم المعوية

Effects of extracts from *T. vulgaris* on Staphylococcal enterotoxins (SEA-SED)

اظهر تقييم انتاج السموم المعوية (SEA وSEB وSEC وSED) بواسطة العزلات الجرثومية *S. aureus* بوجود مستخلصات الزعتر (المائية والكحولية) ان قابلية انتاج السموم تقل مع زيادة تركيز المستخلصات، حيث اظهر كلا المستخلصين تاثير مثبط لانتاج السموم المعوية عند تراكيز مختلفة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، وخصوصا المستخلص الكحولي فقد اظهر تاثير مثبط جيد ضد انتاج السموم المعوية، بينما اظهر المستخلص المائي تاثير مثبط متوسط ضد انتاج السموم المعوية.

اظهرت التراكيز المثبطة الدنيا ان المستخلصات ثبطت انتاج السموم المعوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة كما اظهرت النتائج اختزال طفيف في نمو الجرثومة (الجدول ، 3 و4 و5 و6)، اذ اظهر (الجدول، 4) ان التركيز 400 مايكروغرام/ مللتر للمستخلص الكحولي هو التركيز المثبط الادنى (MIC) حيث ثبط انتاج السم المعوي C وعند مضاعفة التركيز الى 2 (MIC) لم ينتج السم المعوي من كل العزلات الجرثومية مع وجود خلايا جرثومية حية، ولوحظ عند التركيز 100 مايكروغرام/ مللتر للمستخلص الكحولي نمو الجرثومة كان اقل بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، اما انتاج السم المعوي C كان اقل باربع مرات بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، وبالاعتماد على التحليل الاحصائي فقد اظهرت المستخلصات فروق معنوية في انتاج السموم المعوية عند مستوى احتمالية $P\leq 0.05$.

جدول (3): تاثير المستخلص المائي لعشبة الزعتر *T. vulgaris* في انتاج السمان المعويان B وC المنتجان من العزلة الجرثومية *S. aureus* E3.

المستخلص (مايكروغرام/مللتر)	العدد الحي لوغارتم (وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر)	السمان المعويان B و C	
		عيارية السم المعوي B[1]	عيارية السم المعوي C[1]
0	9.87	128	128
100	8.95	64	32
200	8.61	16	16
400	7.72	8	4
800	3.55	ل ي[2]	ل ي[2]

[1] معكوس اخر تخفيف انتج تلازن.

[2] لم يحدد.

مدى تحديد السم المعوي بواسطة الـ RPLA هو 0.5 نانوغرام/ مللتر.

جدول (4): تاثير المستخلص الكحولي لعشبة الزعتر *T. vulgaris* في انتاج السمان المعويان B وC المنتجان من العزلة الجرثومية *S. aureus* E3.

المستخلص (مايكروغرام/مللتر)	العدد الحي لوغارتم (وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر)	السمان المعويان B و C	
		عيارية السم المعوي B[1]	عيارية السم المعوي C[1]
0	9.87	128	128
100	8.95	32	16
200	8.61	8	4
400	7.72	4	ل ي[2]
800	3.55	ل ي[2]	ل ي[2]

[1] معكوس اخر تخفيف انتج تلازن.

[2] لم يحدد.

مدى تحديد السم المعوي بواسطة الـ RPLA هو 0.5 نانوغرام/ مللتر.

ان استمرارتزايد العزلات الجرثومية *S. aureus* المقاومة للعديد من المضادات الحيوية والتي مصدرها من المستشفيات او البيئة ادى الى ضرورة تطوير عوامل جديدة مضادة للجراثيم لمنع وعلاج الاصابات المهددة لحياة الانسان، واتجهت الدراسات في الاونة الاخيرة الى التركيز على المركبات الطبيعية، اذ تحتوي النباتات على العديد من المركبات

العضوية مثل القلويات والعطرية والفينولية وquinines وterpenoids، حيث ان كل هذه المركبات تمتلك فعالية مضادة للجراثيم **(Mallappa *et al.*, 2016)**، واظهرت نتائج التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمستخلصات عشبة الزعتر انها تقع ضمن مدى النباتات الطبية حيث ان لها تاثير مثبط لانتاج السموم المعوية المنتجة من جرثومة *S. aureus*، واظهر تقييم انتاج السموم المعوية (SEA وSEB وSEC وSED) بوجود مستخلصات الزعتر ان قابلية انتاج السموم تقل مع زيادة تركيز المستخلصات.

جدول (5): تاثير المستخلص المائي لعشبة الزعتر *T. vulgaris* في انتاج السمان المعويان A وD المنتجان من العزلة الجرثومية *S. aureus* E6.

المستخلص (مايكروغرام/ مللتر)	العدد الحي لوغارتم (وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر)	السمان المعويان A و D	
		عيارية السم المعوي A[1]	عيارية السم المعوي D[1]
0	9.33	128	128
100	8.47	64	64
200	7.84	32	16
400	7.09	16	4
800	3.96	ل ي[2]	ل ي[2]

[1] معكوس اخر تخفيف انتج تلازن.

[2] لم يحدد.

مدى تحديد السم المعوي بواسطة الـ RPLA هو 0.5 نانوغرام/ مللتر.

جدول (6): تاثير المستخلص الكحولي لعشبة الزعتر *T. vulgaris* في انتاج السمان المعويان A وD المنتجان من العزلة الجرثومية *S. aureus* E6.

المستخلص (مايكروغرام/مللتر)	العدد الحي لوغارتم (وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر)	السمان المعويان A و D	
		عيارية السم المعوي A[1]	عيارية السم المعوي D[1]
0	9.43	128	128
100	8.86	32	32
200	8.61	16	8
400	6.03	4	2
800	3.55	ل ي[2]	ل ي[2]

[1] معكوس اخر تخفيف انتج تلازن.

[2] لم يحدد.

مدى تحديد السم المعوي بواسطة الـ RPLA هو 0.5 نانوغرام/ مللتر.

من جهة اخرى، اصبحت الان هذه الستراتيجية البديلة ذات اهمية في علاج الاصابات الناتجة عن جرثومة *S. aureus*، حيث يكون هدفها عوامل الفوعة للجرثومة مثل (الهيمولايسين والسموم المعوية والالتصاق)، وتلعب العديد من عوامل الفوعة التي تفرزها هذه الجرثومة دور مهم في امراضيتها، لذلك التشخيص السريري واستخدام المضادات الحيوية لعلاج اصابات هذه الجرثومة يجب ان لا يعتمد فقط على التاثير القاتل للجرثومة او المثبط لنموها ومنع تكاثرها وانما تكون لديه القابلية على منع تحرر عوامل الفوعة بواسطة الضغط والتشديد على الجرثومة **(Qiu *et al.*, 2010; Azizkhani *et al.*, 2013)**، ومع ذلك تتطلب هذه الاعشاب العديد من الدراسات لغرض تطبيقها سريريا.

الاستنتاجات Conclusions

تشير نتائج هذه الدراسة الى ان مستخلصات عشبة الزعتر *T. vulgaris* لها دور مهم في اختزال انتاج اهم عوامل الامراضية للجرثومة *S. aureus* وهي السموم المعوية (A-D).

REFERENCES

i. Abachi, S., Khademi, F., Fatemi, H. & Malekzadeh, F. (2013). Study of Antimicrobial activity of selected Iranian plant extracts on vancomycin resistant *Staphylococcus epidermidis*. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*, 4(1), 59-63.

ii. Afzal, S., Ashraf, M., Bukhsh, A. Akhtar, S. & Rasheed, A. D. (2017). Efficacy of antimicrobial agents with ascorbic acid in catheter associated urinary tract infection. *Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine*, 5(3), 166-171.

iii. Al-Jumaily, E. F., Saeed, N. M. & Khanaka, H. H. (2014). Detection of enterotoxin types produce by coagulase positive Staphylococcus species isolated from mastitis in dairy cows in Sulaimaniyah region. *Applied Science Reports*,2(1), 19-26.

iv. Azizkhani, M., Misaghi, A., Basti , A. Gandomi, H. & Hosseini, H. (2013). Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 159-165.

v. Barrett, S. P., Savage, M. A., Rebec, M. P., Guyot, A., Andrews, N. & Shrimpton, S. B. (1999). Antibiotic sensitivity of bacteria associated with community acquired urinary tract infection in Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 359-65.

vi. Behnia, M., Haghighi, A. Komeylizadeh, H. Tabaei, S. & Abadi, A. (2008). Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(3), 153-156.

vii. Caplin, J. L., Allan, I. & Hanlon, G. W. (2009). Enhancing the in vitro activity of *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3, 35-39.

viii. Carlos, L. A. Amaral, K. A. Vieira, I. J. Mathias, L. Filho, R. B. Samarão, S. S. & Motta, O. V. (2010). *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with Staphylococcal density, enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 612-620.

ix. Chihara, S., Popovich, K. J., Weinstein, R. A. & Bala Hota, B. (2010). *Staphylococcus aureus* bacterium as a prognosticator for outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 10, 225-231.

x. Flores, E. M., Nava, R. M., Aguilar, G. R., Carreño, L. R. & García, S. C. (2018). The effect of *Thymus vulgaris* on growth and biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 12(10), 237-242.

xi. Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V. & Pistelli, L. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*, 96, 1-7.

xii. Gad, G. F., El-Feky, M. A., El-Rehewy, M. S., Hassan, M. A., Abolella, H. & El-Baky, R. M. (2009). Detection of *icaA, icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *Journal of Infection in Developing Countries*, 3(5), 342-351.

xiii. Goldstein, F. W. (2000). Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,* 19, 112-117.

xiv. Gonçalves, G. M., Srebernich, S. M., Bragagnolo, N., Madalozzo, E. S., Merhi, V. L. & Pires, D. C. (2013). Study of the composition of *Thymus vulgaris* essential oil, developing of topic formulations and evaluation of antimicrobial efficacy. *Journal of Medicinal Plants Research,* 7(23), 1736-1745.

xv. Imanifoolade, A. A., Sattari, M., Peerayeh, S. N., Hassan, Z. M. & Hossainidoust, S. R. (2007). Detection the *Stapylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from skin infections in hospitalized patients. *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 10(3), 502-505.

xvi. Imanifooladi, A. A., Tavakoli, H. R. & Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(3), 135-140.

xvii. Mallappa, K. S., Mohd, S. A. & Uma, R. S. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12, 564-585.

xviii. Moon, J. S., Rilee, A. E., Jaw, S. H., Kang, H. M., Joo, Y. S., Park, Y. H., Kim, M. N. & Koo, H. C. (2007). Comparison of antibiogram, Staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. *Journal of Food Protection,* 70(11), 2541-2548.

xix. Moussa, L. B., Anani, L., Scheftel, J. M., Couturier, M., Riegel, P., Haikou, N., Sanni, A. & Prevost, G. (2008). Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *Journal of Hospital Infection,* 68(1), 32-38.

xx. Nostro, A., Cannatelli, M. A., Musolino, A. D., Procopio, F. & Alonzo, V. (2002). *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by Staphylococcus aureus. *Letters in Applied Microbiology,* 35, 181-84.

xxi. Qiu, J., Wang, D., Xiang, H. Feng, H. Jiang, Y. Xia, L. Dong, J. Lu, J. & Deng, X. (2010). Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and a-Hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE,* 5(3), 9736-9744.

xxii. Rahimi, E. & Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv,* 83(1), 23-30.

xxiii. Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology,* 44(2), 393-399.

xxiv. Safaei, H. R., Pirasteh, H., Pournasiri, Z. & Dormaneshi, B. (2015). Study the enterotoxigenixity of *Staphylococcus aureus* isolated from the urine samples of pediatrics with UTIs. *Biomedical & Pharmacology Journal,* 8(4), 111-118.

xxv. Saify, H., Patidar, R. K., Khare, M. K., Sahare, N. & Singh, V. (2013). Difference in biofilm development capability of vancomycin and ciprofloxacin resistant

Staphylococcus aureus clinical isolates. *Research Journal of Infectious Diseases,* 37, 55-58.

xxvi. Salih, S. S. (2012). The antimicrobial activity of ethanol extract of *Thymus vulgaris* on *Salmonella typhi in* rabbets. *British Journal of Pharmacology and Toxicology,* 3(4), 147-150.

xxvii. Sina, H., Ahoyo, T. A., Moussaoui, W., Keller, D., Bankolé, H., Barogui, Y., Stienstra, Y., Kotchoni, S., Prévost, G. & Baba-Moussa, L. **(**2013). Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. *BMC Microbiology,* 13: 188-196.

xxviii. Solano, R., Lafuente, S., Sabate, S., Tortajada, C., Olalla, P. G., Hernando, A.V. and Caylà, J. (2013). Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*: An outbreak at a Barcelona sports club in July 2011. *Food Control,* 33: 114-118.

xxix. Souza, E. L., Barros, J. C., Oliveira, E. V. & Conceição, M. L. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology,* 137, 308-311.

xxx. Udo, E. E., Al-Sweih, N. & Noronha, B. (2006). Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait hospitals. *Clinical Microbiology and Infection,* 12: 262-269.

xxxi. Wei, Z., Zhou, E., Guo, C., Fu, Y. Yu, Y. Li, Y., Yao, M. Zhang, N. & Yang, Z. (2014). Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF-κB activation. *Microbial Pathogenesis,* 71-72, 15-19.

xxxii. Yazdi, F. T., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S. & Behbahani, B. (2013). Antimicrobial properties of plant extracts of *Thymus vulgaris* L., *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha Spicata* L., against important food borne pathogens *in vitro*. *Scientific Journal of Microbiology,* 2(2), 23-30.