Bacterial contamination of meat and vegetable cutting board used in restaurants and houses and the role of detergents in controlling on contamination

التلوث البكتيري لألواح تقطيع اللحوم والخضروات المستخدمة في المطاعم والمنازل ودور المنظفات في السيطرة على التلوث

م. م. رنا عبد الحمزة عبد الزهرة – م. م. سحر عبد الرضا جابر – م. م. ضرغام حسن شاطي
جامعة كربلاء /كلية العلوم

الخلاصة

تم جمع ودراسة 25 عينة من مسحات ألواح التقطيع (خشبية، بلاستيكية، زجاجية) من مواقع مختلفة داخل وخارج الحرم الجامعي لجامعة كربلاء ، خضعت جميع العينات للزرع البكتيري للتعرف على صفاتها المظهرية وذلك باستخدام الأوساط الزرعية العامة والاختيارية. اذ أمكن التوصل الى أن بكتريا *Staphylococcus aureus* كانت تمثل النسبة الأكبر حيث بلغت النسبة المئوية لعزلها(24.32 ± 1.00)% من العزل الكلي ، تلتها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و بنسبة (0.02±21.62)% بينما احتلت بكتريا *Klebsiella* على (0.01±16.22) % وبكتريا *E.coli* على (1.00±16.22) % وحصلت بكتريا *Enterobacter* و *Shigella* على (0.04±8.11) و (1.00±8.11) % لكل منهما و أما بكتريا *Salmonella* فقد كانت نسبتها (0±5.40) % من المجموع الكلي للعزل . وتم اجراء اختبار حساسية البكتريا المعزولة تجاه بعض المنظفات المحلية باستخدام طريقة الحفر بالاكار (M.H.A) Muller Hinton Agar ووجد تقريباً أن جميع العزلات قيد الدراسة حساسة عند التركيز 20% فما فوق ولكنها مقاومة للتركيز 10%.

Abstract :

The collection and study of 25 samples which (swabs from cutting boards, wood, plastic, glass) from different locations inside and outside the campus of the University of Karbala, all samples underwent to cultivate for identify the bacteria and thier phenotypic characteristics, using general and selection culture media . the bacteria *Staphylococcus aureus* the largest proportion, where the percentage to isolate (24.32 ±1.00) % of the total isolation , followed by *Pseudomonas aeruginosa* with (0.02± 21.62)% and all of the bacteria *Klebsiella* and *E.coli* accounted for (1.00±16.22)% and (0.01±16.22)% for each one while got *Enterobacter* and *Shigella* on (0.04±8.11)% and (1.00±8.11)% for each one from finally the *Salmonella* was (0±5.40)% of total isolation. the sensitivity of bacteria isolates toward some local detergents using a agar wall diffusion method by using (M.H.A) Muller Hinton Agar was found that almost all isolates were sensitive under study at the concentration of 20% and above, but resistance to the concentration of 10%.

المقدمة Introduction

أن الوظيفة الأساسية لألواح التقطيع المستخدمة في المطبخ اعطاء سطح مناسب للتقطيع يتميز بكونه آمن وثابت ومريح للاستخدام لكن هنالك نقطة مهمة جداً وهي أن ألواح التقطيع من أخطر الأدوات في المطبخ التي تسبب التسمم الغذائي [1].

تصنع ألواح التقطيع من مواد عديدة ،وذات احجام واشكال مختلفة ،العديد من النقاشات كثرت على نوع المواد التي يجب ان تكون عليها ألواح التقطيع اذ أظهرت الدراسات تفضيلاً لألواح التقطيع البلاستيكية لأنها تبدو أسهل في التنظيف، وفي دراسة اخرى اكدت أن ألواح التقطيع الخشبية تكون أكثر أماناً من البلاستك ،فلكل نوع ايجابياته وسلبياته [2].

تتعرض ألواح التقطيع المتواجدة في المنازل والمطاعم وبعض المؤسسات المهمة مثل دور الحضانة والمدارس والمستشفيات أثناء عملية إعداد وتحضير الطعام الى التلوث بالأحياء المجهرية مثل البكتريا والفطريات والطفيليات والفايروسات من مصادر مختلفة حيث يبدأ التلوث من الغذاء الخام ذو المصدر النباتي أو الحيواني والذي ينتج في بيئات طبيعية مليئة بالأحياء المجهرية فالفواكه والخضروات وكذلك الحيوانات تحمل العديد من الأحياء المجهرية والتي تأخذ طريقها الى الأغذية. وتكون هذه الأنواع مصدراً مهماً لأمراض خطيرة على صحة الانسان مثل مرض حمى التايفوئيد والالتهابات المعوية [3].

ان التسمم الغذائي الذي تسببه ألواح التقطيع في المطابخ يسمى بالتلوث الخطي Cross contamination وهو ناتج من تلامس المادة الملوثة مع مادة غير ملوثة والتي بدورها تلوث مواد أخرى ،اذ تمتاز البكتريا بأن لها القدرة على التعلق والالتصاق على أي سطح،وبالتالي تعد الامراض المنقولة بالأغذية الملوثة في البيئات المحلية قضية اساسية [4].

تمتاز بكتريا *S. aureus* بامتلاكها لعدد من العوامل التي تساهم في امكانية تواجدها في بيئات عديدة كبيئة ألواح تقطيع اللحوم ، بالتالي الانتقال للإنسان لإحداث المرض [5] .

تعد المنظفات وسيلة مهمة وغير مكلفة لمنع انتقال العدوى بالاحياء المجهرية لكونها فعالة في إزالة الملوثات التي تتضمن البكتريا الممرضة أو الفايروسات او الطفيليات ،وتتوفر منظفات صناعية متنوعة شائعة توصف كـ Antibacterial أو Antimicrobial ، antimicrobial تتميز باحتوائها على مركبات ingredients ذات فعالية مضادة مايكروبية نشطة [6]. فالمنظفات الصناعية بالوقت الحاضر مصنوعة اما من البتروكيماويات (المشتق من الدهون والزيوت) او من مواد كيميائية أخرى (مثل ثالث أكسيد الكبريت وحامض الكبريتيك و أكسيد الإيثيلين والقلويات) و جميعها تمتلك فعالية قاتلة للميكروبات Bactericidal[7] .

لذا هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية المتواجدة على سطوح ألواح التقطيع. واختبار الفعالية البيولوجية للمنظف الصناعي تجاه عدد من الأجناس البكتيرية الممرضة.

المواد وطرائق العمل (Materials & Methods)

1- جمع العينات

جمعت 25 مسحة من ألواح التقطيع خشبية و بلاستيكية من البيوت والمطاعم باستخدام المسحات الجاهزة Transport Media حاوية على وسط زرعي ، بعد نقلها الى المختبر تم حضنها مدة 24 ساعة بعدها زرعت على وسط Nutrient agar وحضنت على $37C°$ لمدة (24) ساعة لغرض العزل والتشخيص.

2- عزل البكتريا

نقلت المستعمرات النامية الى الأوساط الاختبارية متمثلة بـ Mannitol salt agar لعزل الأنواع التابعة لجنس *Staphylococcus*،واستخدم وسط الـ Blood agar بالاضافة الى كونه وسط عام في معرفة نوع التحلل $(\alpha.\beta.\gamma)$ للأجناس البكتيرية ،والـ MaCconky agar لعزل البكتريا المعوية سالبة الاستجابة لصبغة غرام ثم نقلت الى وسط E.M.B وذلك للتفريق بين بكتريا *E.coli* و *Klebsiella* sp. و *Enterobacter* sp. ، والـ S.S. agar لتشخيص ولتفريق بين بكتريا *Salmonella* sp. والـ *Shigella* sp. ، ولدراسة الخصائص المرزعية من شكل وحجم ولون المستعمرات وقدرتها على تخمر سكر اللاكتوز تحت ظروف تنمية لمدة 24 ساعة حسب ما جاء في (8) .

3- تشخيص البكتريا

شخصت الصفات المظهرية التي تضمنت شكل وحجم ولون المستعمرات وقوامها ثم فحصت مجهرياً لغرض وصف شكل الخلايا من خلال تصبيغها بصبغة غرام للمستعمرات النامية على الأوساط الاختبارية . وبعد ذلك اجريت الاختبارات الكيموحيوية لدراسة الخصائص والتعرف على العوامل المسببة للأمراض وتشمل هذه الاختبارات اختبار الكاتاليز Catalase و اختبار Oxidase[9] .

4- فحص الفعالية البايولوجية للمنظفات الصناعية تجاه بعض أنواع البكتريا المعزولة

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية المرضية تجاه تراكيز مئوية متزايدة من المنظف المحلي (الوزير) 10% -15%-20%-25%-30%-35%-40% ،بطريقة الحفر بالاكار (Agar well diffusion) لتحديد فعالية المنظف الصناعي . اذ تم تحضير عالق البكتيريا الفتية بنقل (3-5) مستعمرات الى المحلول الفسيولوجي وضبطت عكرته مع الأنبوب الأول من أنابيب ماكفرلاند القياسية (Macferland tub No.1) ونشر منه 0.1 مل على وسط أكار مولرهنتون وتركت الأطباق مدة 15 دقيقة لتشرب المزروع البكتيري وعملت الحفر(Well) باستعمال ثاقب فليني معقم على مسافات متساوية في أطراف الطبق ،عند اجراء الاختبار تم نقل 100 مايكروليتر من كل تركيز في كل حفرة ثم حضنت الأطباق في درجة $37C°$ لمدة 24-48 ساعة. ثم قيست أقطار مناطق التثبيط باستخدام المسطرة وحددت فعالية كل تركيز بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition zone حول كل حفرة [11,10].

ولقد تم اختيار وسط مولر هنتون الصلب في اختبار الحساسية تجاه المنظفات المحلية وذلك لسرعة نمو البكتريا الممرضة المستخدمة ،وكون الوسط غير مدعم بالمغذيات إضافة الى ثبوتية الرقم الهيدروجيني الذي لا يتداخل مع فحص المنظف المستخدم[12].

5- التحليل الاحصائي

كل النتائج حللت احصائيا وباستخدام التحليل الاحصائي ANOVA test واختبار LSD عند مستوى احتمالية 0.0001 .

النتائج والمناقشة (Results and Discussion)

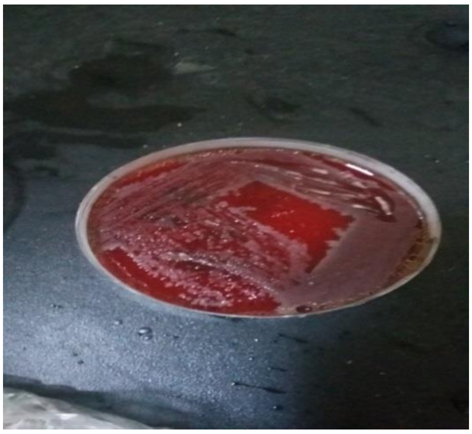
1- النتائج

أجريت الفحوصات التشخيصية والكيميائية الحيوية والتي تضمنت الفحص المجهري للشرائح الملونة بصبغة غرام حيث سجلت اعلى نسبة لبكتريا *S. aureus* على الأنواع البكتيرية الأخرى كما أجريت الفحوصات التشخيصية والتأكدية لجميع العينات والتي شملت كلاً من النمو على الوسط Blood agar كما في الشكل (1) ووسط Mannitol salt agar كما في الشكل رقم (2) ووسط Macconkey agar كما في الشكل (3) ووسط Eosin methylene blue كما في الشكل (4) وكذلك فحص Catalase وفحص Oxidase . والجدول رقم (1) نتائج هذه الفحوصات :

جدول رقم (1) الفحوصات التشخيصية وكيموحيوية للعزلات من ألواح التقطيع

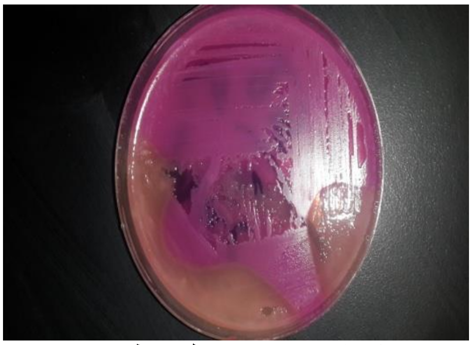
	Gram Stain	Mannitol salt agar	Macconkey agar	Blood agar	Salmonella shigella agar	Catalase	Oxidase
Salmonella	-rod	-	-	γ	+	+	-
Shigella	-rod	-	-	γ	+	D	-
E.Coli	-rod	-	+	β	-	+	-
S.aureus	+cocci	+	-	β	-	+	-
Klebsiella	-rod	-	+	γ	-	+	-
Enterobacter	-rod	-	+	γ	-	+	-
Pseudomonas	-rod	-	-	β	-	+	+

(D) = ان الكثير من السلالات تكون موجبة الاختبار.



شكل رقم (1) يوضح نمو البكتريا على وسط Blood agar (وسط اغنائي)

شكل رقم (2) يوضح نمو بكتريا *S.aureus*على وسط Mannitol salt agar



شكل رقم (3) يوضح نمو بكتريا Enterobacter على وسط Macconkey agar

شكل رقم (4) يوضح نمو بكتريا E.Coli وبكترياKlibsella على وسط E.M.B

وأظهرت نتائج التشخيص الأولي للبكتريا المعزولة من مسحات ألواح التقطيع (المأخوذة من المنازل والمطاعم وكافتيريا العلوم ونادي الطلاب المركزي) وباستخدام التحليل الاحصائي ANOVA test للبيانات عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.0001 للمتوسطات التي تحمل فروق متشابه اذ شكلت البكتريا *S. aureus* 24.32% بينما كانت النسبة 21.62% لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و 16.22% لكلا من بكتريا *Klebsiella* و *E.coli* بينما حصلت كل من بكتريا *Eenterobacter* و *Shigella* على 8.11% اما *Salmonella* فقد تم عزلاها بنسبة 5.40% وكما موضح في الجدول (2)

جدول رقم (2) أعداد وأنواع البكتريا المعزولة من عينات ألواح التقطيع

نوع البكتريا	عدد العزلات	النسبة المئوية %
S. aureus	9	1.00±24.32
Pseudomonas aeruginosa	8	0.02± 21.62
E.coli	6	1.00±16.22
Klebsiella	6	0.01±16.22
Enterobacter	3	0.04±8.11
Shigella	3	1.00±8.11
Salmonella	2	0±5.40
37		LSD = 1.1767

حيث اثمرت النتائج الحصول على بكتريا *S. aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *E.coli* و *Klebsiella* sp. و *Enterobacter* sp. و *Shigella* sp. و *Salmonella* sp. ويعزى سبب ذلك الى ان طريقة غسل وحفظ ألواح التقطيع غير كفوءة فعند استعمالها تؤدي الى التلوث المايكروبي وفسح المجال لنمو وتكاثر المايكروبات على سطح تلك الألواح وبتالي تنتقل هذه البكتريا الى الإنسان عند استعمال هذه الألواح مسببة أمراضاً مختلفة كتشنجات وإسهال دموي وغيرها [13] .

فقد نالت بكتريا *Staphylococcus aureus* على اعلى نسبة عزل وهذه النتيجة جاءت مطابقة لما توصل اليه [14]. ويعزى سبب سيادة بكتريا *Staphylococcus aureus* في هذه البيئة الى امتلاكها لعددا من عوامل الضراوة التي تحميها من الجهاز المناعي و مقاومة الظروف الغير اعتيادية وكذلك مقاومة مدى واسع من المضادات الحيوية و المطهرات و المنظفات والتي أصبحت في الوقت الحالي مشكلة صحية عالمية . ومن هذه العوامل بروتين A الذي يرتبط بجدار الخلية الذي يعيق عمل جزيئة IgG وكذلك Exopolysaccharide وحامض التيكويك (Teichoic acid) والببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) والتي تعمل على حماية البكتريا من عملية البلعمة (Phagocytosis) [15] .

اما فيما يخص سلوك تلك البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية و المنظفات و المطهرات فهي تمتلك عدة طرق لذلك الفعل كتحوير مواقع الهدف أو تغير نفاذية الأغشية الخارجية لجدران الخلية البكتيرية او من خلال تغيير المسارات الايضية لها و كذلك إفرازها لإنزيمات محورة ومنها Phospholipase C , Hyaluronidase , Coagulase , alkaline protease and staphylolytic protease , Thermostable deoxyribonuclease , Ribonuclease, ,Catalase, Fibrinolysins , α-,β-,δ- Hemolysins التي تعمل على اتلاف الانسجة و غزو الدم [16] . فقد امتلكت بكتريا *E. coli* العديد من عوامل الضراوة Mannose resistant adhesions و Hemolysin و pili و Toxins [17] ، كما ان الامكانية الامراضية لبكتريا *Klebsiella* تكمن في امتلاكها للعديد من هذه العوامل التي تتداخل مع المضيف ومنها Capsule ، Fimbriae ، Toxins ، Sidrophores و Lipopolysaccharide [18] ، و اما بكتريا Enterobacter فانها تمتلك قابلية على انتاج السموم (Toxins) الداخلية و الخارجية وكذلك Lipopolysaccharide و Phosphatase وغيرها من العوامل [19] .

اما بكتريا *Salmonella* فقد امتلكت العديد من عوامل الضراوة مثل Fimbriae ، Toxins ، Flagella و Lipopolysaccharide [20] . وتبرز امراضية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من خلال امتلاكها للـ Pili و siderophores و Toxins و Alginate التي تكون Biofilm الذي يحميها من عملية البلعمة للمضيف [21] ، فضلا عن انتاج بكتريا *Shigella* للسموم كعامل ضراوة [22] .

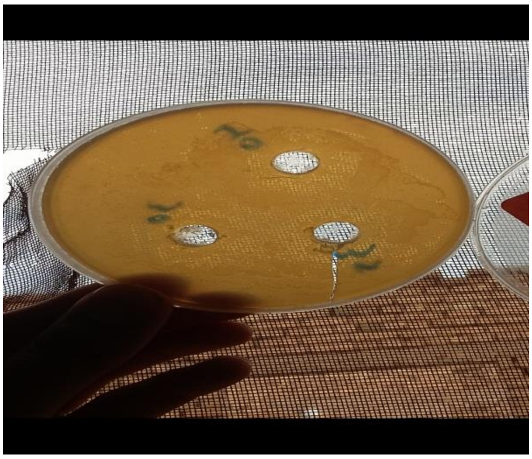
3- الفعالية البايولوجية للمنظفات المصنوعة محلياً على الأنواع البكتيرية المعزولة

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ANOVA test للبيانات عن وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.001 لاختبار الفعالية البايولوجية لثلاث اجناس بكتيرية الاكثر عزلاً من مسحات ألواح التقطيع تجاه مجموعة من تراكيز المنظف المصنوع محلياً وكما مبين في جدول رقم (3) اذ ان البكتريا الموجبة لصبغة غرام والمتمثلة بـ *Staphylococcus aureus* تكون أكثر حساسية لتراكيز المنظف مقارنة مع البكتريا السالبة لصبغة غرام المتمثلة بـ *Salmonella* sp. و *Klebsiella* sp. ويعود سبب ذلك لأن بكتريا *Salmonella* و *Klebsiella* تكون مقاومة وذلك لامتلاكها جدار خلوي قليل النفاذية [23] وكما مبينة في الشكل (5) ، (6) ، (7) .

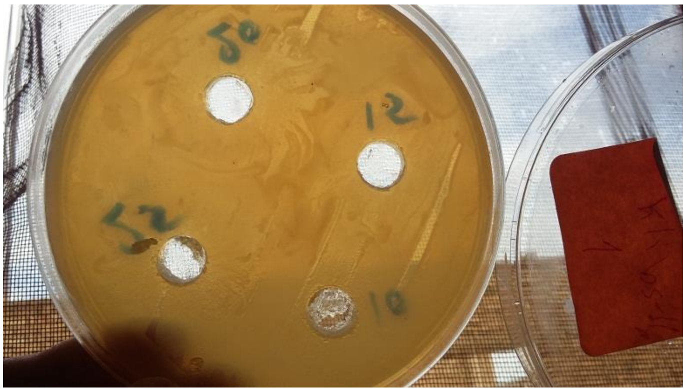
يعتبر جدار الخلية البكتيرية هو الهدف لأي من المضادات الميكروبية والمطهرات والمنظفات، فالمنظف المشار إليه في الدراسة وجد أنه يحتوي على حامض السلفونيك وثنائي ايثانول امين، وهذه المركبات الكيميائية لها دور في التاثير على طبيعية

نشاط الخلية والتدخل في التمثيل الغذائي، وهذه الإمكانية تعتمد على عدة عوامل مثل خصائص الكائنات الحية ووقت الاتصال ومكونات المنظف والتركيز والحساسية المايكروبية في لوحة التقطيع [24].

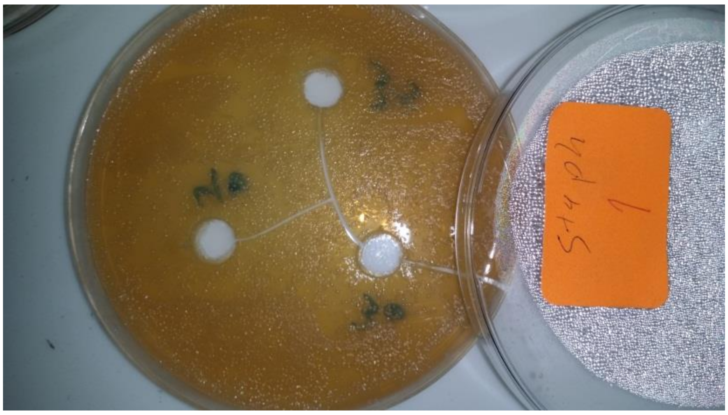
وجاءت هذه الدراسة مشابه لما ذكر Rama عندما وجدا ان التركيز المثبط للمنظفات يزداد بزيادة التركيز خلال دراستهم لمجموعة واسعة من المنظفات والصابون ويعزى سبب ذلك لامتلاك تلك المنظفات عدد كبير من المكونات الكيميائية التي تعمل على تثبيط الفعاليات الايضية ونمو البكتريا وقتلها [25] .



شكل رقم (5) يوضح حساسية بكتريا *Salmonella* sp. تجاه المنظفات الصناعية



شكل رقم (6) يوضح حساسية بكتريا *Klebsiella* sp. تجاه المنظفات الصناعية



شكل رقم (7) يوضح حساسية بكتريا *S. aureus* تجاه المنظفات الصناعية

جدول رقم (3) اختبار الفعالية البايولوجية للمنظفات المصنوعة محلياً على الأنواع البكتيرية المعزولة

التركيز / نوع البكتريا	10	15	20	25	30	35	40	المعدل
Salmonella sp.	0	2mm	2.2mm	2.5mm	2.9mm	3.2mm	3.4mm	2.30± 0.3904
Klebsiella sp.	0	0	2.4mm	3.2mm	3.6mm	3.8mm	4.2mm	2.45± 0.3904
S. aureus	2.2	2.6mm	3mm	3.2mm	3.4mm	3.6mm	4mm	3.14± 0.3904
المعدل	0.73± 0.5963	1.53± 0.5963	2.53± 0.5963	2.96± 0.5963	3.26± 0.5963	3.53± 0.5963	3.86± 0.5963	
LSD 1.0328								

References

1) AK, N.O; liver, D.O.C and Kasper ,C.W.(1998). Cutting board of plastic and wood contamination experimentally with bacteria. *J. food protect*.; 57: 16- 22.
2) http:// www.mountainwood worker. Com / articles / cutting – board. Pdf.
3) عبد ، هدى سهيل (2010). التلوث البكتيري لوجبات الاغذية المقدمة في مطاعم محافظة دمار في الجمهورية اليمنية ودور العاملين مع الغذاء كمصدر للتلوث. مجلة جامعة كربلاء العلمية. 2(1)
4) Abrishami, S.I. ; Tall, B. D. ; Buurrsema ,T.J. ; Epstein, P.S. and Shah. D.B. (1994).Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces. *J. food safety* ;4: 154- 172.
5) Marta, V.-I . ; Tomas, M.-L. ; Nekane, M. ; Gerald , B. ;Pier, J. ; R. P. and Inigo, L. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *J. Microbiology* , 154: 865–877.
6) Kim, S. A.; Moon, H. ; Lee, K. and Rhee, M.S. (2015). Bacterial effects of triclosan in soap both in vitro and in vivo. *Journal of antimicrobial chemotherapy*: 1- 8.
7) Rama , B. P. ; Prajna, P. S. ;Vinita, P. M. and Pavithra, S. (2011) . Antimicrobial Activities of Soap and Detergents. *j. Adv. Biores*. 2 (2): 52- 62.
8) Buchanon , U.R..E. and Gibbons, N. E. (1974) . Bergeys manual of determinative Bacteriology . 8th edition , the Williams and Wilkins company Ltd., *Baltomore* , 22-35 .
9) Baron, E.; Peter Sonee, L.R. and Fine goldens, S.M.(1995). Baileg Scotts Dia Gnostic microbiology. 9thed, the C,V. *mos by company*.USA.
10) Selvamohan; VandSandhya, T.(2012).studies on the bactericidal activity of different Soaps again bacterial strains .*Journal of Microbilogy and Biotechnology Research* ;(5): 646-650.
11) CLSI. (2012).Berformance Stamdards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ;Approved Standard-Elevendth Edition.32(1).*Clinical Labaratory Standerds in stitufe Wayne.PA*,USA.
12) Roosjen A.; Busscher, H.J; Norde. W. and Vander, H.C. (2006). *Microbiology*.; 159: 26- 73.
13) Sofos, J.N. (2009). “Biofilms. Our constant Enemies. “Food safety magazine; 15(1): 38-41.
14) Christina , M. L. ; Thomas , S. ; Andreas , K. ; Patrick , S. ; Alexander , P. ; Gertie J. O. and Markus , H. (2013) . Active Anti – microbial effects of larch and pine wood on four bacterial strains . *J. BioResour*., 9 (1): 273 – 281 .
15) Marta , V. – I. ; Tomas, M.-L . ; Nekane , M. ; Gerald , B. P. ; Jose, R. ; Penades S. and Inigo, L. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *J. Microbiology* , 154 (3): 865–877.
16) Ani , I. C. ; Mariana , C. C. ; Sorin , D. ; Marcela , B. ; Carmen , I. ; Otilia , B. ; Olguta , D. ; Cristina , L. and Veronica , L. (2010) . Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections . *Int. J. Mol. Sci*., 11: 5273-5291.
17) **خاكي** ، اكرام امين و الثويني ، امنه نعمة و القريشي ، جعفر جمعة حسوني .(2011) . تعيين بعض عوامل الضراوة مظهريا للبكتريا المعزولة من المرضى المصابين بالتهابات المسالك البولية المتكررة . كلية الطب جامعة واسط .
18) Siham, S. A. ; Yusra, A.R. M. and Ali, S. A.(2012). Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city . *Tikrit Journal of Pure Science* :17 (4) 17-25 . ISSN: 1813 – 1662.
19) سليمان ، سراب داود و شريف ، اديبة يوسف .(2007) . التحري عن عدد من عوامل الضراوة جرثومة *Enterobacter cloacae* المعزولة من حالات اسهال الاطفال في الموصل . مجلة علوم الرافدين .18(12): 23-31.
20) Renee, M. T.; GARRY, A. L. ; THOMAS, A. F.and ANDREAS, J. B.(1999) . Contribution of *Salmonella typhimurium* Virulence Factors to Diarrheal Disease in Calves. *INFECTION AND IMMUNITY* : 67(9) : 4879–4885.

21) Ben, H. K. A.; Moissenet , D. ; Vu, T. H. and Khedher , M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann. Biol. Clin.* (Paris) , 69(4):393-403. doi: 10.1684/abc.2011.0589.

22) Shih-Chun, Y. ; Chi-Feng , H. ; Ibrahim , A. A. and Jia-You, F. (2015) . The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella* spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells . *Microbiol. Res*., 181: 43–51. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.006

23) Dendel, C.; Mulveg, S.; Pyrlis, F. ; Grayson, M.L. and P.D.R.(2007). Jahnsonclinl. *Infect. Dis*.; 45.29.

24) Whitehouse station (NJ) Merck and co.Inc.,(2008): The Merck veterinary manual- Tropical antifungal agent. Assessable at, www.Merck vet manual.com.

25) Rama , B. P. ; Prajna, P.S. ; Vinita, P. M. and Pavithra, S.(2011). Antimicrobial Activities of Soap and Detergents. *Adv. Biores*., 2 (2) : 52-62 . ISSN 0976-4585.