مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (١) / المجلد (٢٤) : ٢٠١٦

انتشار وانتاج السم المعوي enterotoxin B والحساسية للمضادات الحيوية لعزلات جرثومة المكورات العنقودية المعزولة من الاسهال

ايمان جواد كاظم

الكلية التقنية-المسيب

imanprof9@gmail.com

الخلاصة

جمعت 175 عينة من مسحات الاسهال. وقد حصلت على 12 عزلة جرثومية أي بنسبة عزل (6.7%) تعود للنوع *Staphylococcus aureus* . من بين 12 عزلة كانت ثمانية (66.7%) لها القابلية على انتاج السم. تم الكشف عن حساسية العزلات الجرثومية الى 20 مضاداً حيوياً، واظهرت النتائج ان جميع العزلات كانت مقاومة لاثنين من المضادات الحيوية هما ampicillin و penicillin. بينما اظهرت جميع العزلات الجرثومية حساسة للمضاد الحيوي الـ Fusidic acid. واظهرت العزلات الجرثومية درجات مقاومة مختلفة لمضادات حيوية اخرى مثل الـ erythromycin والـ tetracycline والـ oxacillin والـ methicillin والـ trimetheprim . لذا تظهر نتائج الدراسة الانتشار الواسع للعزلات الجرثومية ذات السمية فضلاً عن مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية. اظهرت اربع عزلات جرثومية (SA2,SA4,SA11,SA12) قابليتها على انتاج السم عند درجة حرارة 20°م. بينما اظهرت ثلاث عزلات جرثومية (SA2, SA11,SA12) قابليتها على انتاج السم عند درجة حرارة 45°م. لوحظ انتاج السم عند اقل قيمة للرقم الهيدروجيني هو 4 وذلك للعزلتين SA4 و SA12. وهاتان العزلتان لهما القابلية على انتاج السم عند اعلى قيمة للرقم الهيدروجيني 10.5. تظهر النتائج ان انتاج السم يقع ضمن مدى واسع من قيم الرقم الهيدروجيني لذا يمكن اعتبار الحرارة من العوامل البيئية المحددة لانتاج هذا السم.

الكلمات المفتاحية: السم المعوي، المضادات الحيوية، الحرارة ، الرقم الهيدروجيني

Abstract

One hundred and seventy five samples were collected from diarrhea swabs, twelve isolates (6.7%) were obtained and diagnosed as *Staphylococcus aureus*. The production of enterotoxin B were tested by using reverse passive latex agglutination. Eight isolates (66.7%) had the ability to producing enterotoxin B. *S. aureus* were 100% resistancy were recorded for two antibiotics, ampicillin and penicillin, while in the opposite direction, 100% sensitive to Fusidic acid **.** Graded resistant was observed in other antibiotics, include: 66.7% for erythromycin, tetracycline, oxacillin and methicillin. The results of this study showed the wide spread of enterotoxigenic and multidrug-resistant *S. aureus* isolates isolated from diarrhea samples. The lowest temperature at which SEB production manifested was 20°C in four isolates (SA2,SA4,SA11 and SA12), while the highest temperature at which SEB was produced was 45°C, in three isolates (SA2,SA11 and SA12). The lowest pH value at which SEB production was still observed was 4 in two isolates (SA4 and SA12) . These isolates were able to produce SEB even at pH 10.5, which was the highest pH value among the isolates studied. SEB is produced within a wide pH range but the influence of temperature is an essential one for the production of this toxin.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin B , Antibiotics, diarrhea

المقدمة

جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* من مسببات الأمراض الأكثر شيوعا في بيئة المستشفيات، ويعتبر هذا الجنس من العوامل المسببة لمجموعة كبيرة ومتنوعة من الاصابات (Cunha and Calsolari, 2008; Rong *et al*., 2010). حيث تعد جرثومة الـ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) من الممرضات الرئيسة والهامة للانسان، و لها القابلية على ان تسبب مدى واسع من الأمراض، ابتداء من الاصابات الجلدية خفيفة والتسمم الغذائي الى اصابات تهدد حياة الانسان، مثل خراجات عميقة و التهاب العظم والنقي والالتهاب الرئوي و الالتهاب الرئوي الناخر , التهاب شغاف القلب و متلازمة الصدمة السامة و تجرثم الدم و التهاب المفاصل والإنتان. ويمكن لهذه

الجرثومة أن تصيب أي عضو في جسم الانسان، مثل نسيج العظم وصمامات القلب . تكون امراضية هذه الجرثومة اكثر شدة في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة. (Rosengren *et al.*, 2010; Spauldinga *et al.*,2012; Kristlová *et al.*, 2012; Arslan and Özdemir, 2012; Nada *et al.*, 2012;Podkowik *et al.*, 2013; Argudín *et al.*, 2013; Rahimi and Alian, 2013;). ويصعب السيطرة على الاصابات الناتجة عن هذه الجرثومة نتيجة للعديد من العوامل منها عوامل الفوعة المقترنة بسمية الجرثومة وقابليتها على الاجتياح ومقاومتها للمضادات الحيوية (Adwan *et al.*, 2006; Qiu *et al.*,2010; Wei *et al.*, 2014).

تفرز معظم سلالات الجرثومية مجموعة من الإنزيمات والـ cytotoxins والتي تتضمن الـ hemolysins والـ nucleases والـ proteases والـ lipases والـ hyaluronidase والـ collagenase . قد تكون المهمة الرئيسة لهذه الانزيمات هو تحويل الأنسجة الموضعية للمضيف (العائل) إلى العناصر الغذائية اللازمة لنمو الجرثومة (Pereira *et al.*, 2009) . تنتج بعض سلالات هذا الممرض مجموعة واسعة من البروتينات السامة ومنها السموم المعوية Staphylococcal enterotoxins (SEs) والـ toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) والسموم الـ exfoliative toxins (ETs) والـ leukocidin. هذه السموم هي المسؤولة عن الاصابات الجرثومية ذات السمية مثل الـ scalded skin syndrome والتسمم الغذائي بالجرثومة (Mainaa *et al.*, 2012;Wu *et al.*, 2013).

تعد السموم المعوية SEs المنتجة من الجرثومة من عوامل الفوعة الرئيسة التي تسبب التهاب المعدة والأمعاء staphylococcal gastroenteritis فضلاً عن انها أحدى مسببات التسمم الغذائي في الانسان (Al- Jumaily *et al.*,2014). وقد وصفت هذه السموم المعوية أول مرة في عام 1959 .هذه السموم المعوية لها القابلية على مقاومة الحرارة، وبالتالي قد تظهر هذه السموم حتى لو كانت جرثومة الـ *S. aureus* غير موجودة في الطعام. حتى الان قد وصيف 23 نوعاً من السموم المعوية المنتجة من هذه الجرثومة (Rajkovic,2012;Wua *et al.*,2013;Chiao *et al.*,2013).تنتمي السموم المعوية إلى عائلة واسعة من السموم المولدة للحمى (Zhang *et al.*,2013). للسموم المعوية القابلية على الذوبان في الماء وهي عبارة عن بروتينات كروية تتكون من سلسلة مفردة من متعدد الببتيد، تكون هذه البروتينات مستقرة هيكليا مع الوزن الجزيئي تتراوح 22-29 كيلو دالتون .وتكون الصفة الشائعة للسموم المعوية هي الاستقرارية العالية والمقاومة تجاه معظم الإنزيمات المحللة للبروتين، مثل البيبسين أو التربسين، مما يتيح لها المحافظة على فعاليتها في القناة المعدية المعوية (Can and Celik,2012;Solano *et al.*,2013). تأتي السموم المعوية لهذه الجرثومة في المركز الثاني من بين العوامل المسببة للأمراض المنقولة عن طريق الأغذية، وسجلت 5000 حالة وفاة سنويا في الولايات المتحدة .في غضون ساعات قليلة من ابتلاع كميات من السموم المعوية تقدر بالميكروغرام تسبب التسمم الغذائي مع الأعراض الكلاسيكية التي تشمل القيء والاسهال والغثيان وآلام في البطن (Danielsen *et al.*,2013).

يعد السم المعوي من النوع B (SEB) من عامل الفوعة الرئيسة لأمراضية الجرثومة (Yarovinsky *et al.*,2005) . باعتبار ان السم المعوي B واحد من المسببات الرئيسة للتسمم الغذائي، يكون هذا السم غاية في السمية حيث وجد ان الجرعة النصف مميتة (LD50) تقدر بـ 20 نانوغرام \ كغم بينما كانت الجرعة النصف فعالة (ED 50) تقدر بـ 0.4 نانوغرام \ كغم. تعد السموم المعوية من نوع A و B من اكثر العوامل المسببة لالتهاب المعدي المعوي gastroenteritis . وهذان النوعان من

السموم (A, B) هما من اكثر العوامل المسببة للتسمم الغذائي اكثر من 60% في الولايات المتحدة الأمريكية وإنجلترا. في الواقع يعد النوع B هو السم المعوي الأكثر أهمية الذي يسبب التهاب المعدة والأمعاء Imani). (*et al.*,2010 ووفقا لدراسات سابقة، وجد ان 100 نانوغرام من السم المعوي نوع B تجعل الشخص مريض مع أعراض التسمم الغذائي الكلاسيكية (Rong *et al.*, 2010) . من المرجح أن يكون السم المعوي من النوع B مرتبط مع عدوى المستشفيات(Nostro *et al.*,2002).). لذا يعد السم المعوي B من العوامل المهمة المسببة للأمراض التي تصيب الانسان، لذا من المهم الوصول إلى طرق للسيطرة على الأمراض الناجمة عن السم المعوي النوع B (Ataee *et al.*,2011; Yan *et al.*,2014) .

ان أمراض الجهاز الهضمي هي من أكثر المسببات شيوعا للامراضية والوفيات في البلدان النامية (Vieira *et al.*,2001). وتعد الجرثومة *S. aureus* واحدة من المسببات الرئيسة للامراض في جميع أنحاء العالم . وتحتل الجرثومة المركز الثالث في العالم كاحد المسببات للامراض المنقولة بالأغذية (Souza *et al.*,2010). اي ان هذه الجرثومة وسمومها المعوية تشكل تهديدا لصحة الإنسان في جميع أنحاء العالم (Shareef *et al.*,2009;Principato and Qian,2014).

هناك تقنيات متوفرة تجارياً لها القابلية على الكشف عن السموم المعوية حيث تتطلب ساعة ونصف الى اربعة وعشرون ساعة . وقد سجل انه يمكن الكشف عن السموم المعوية ضمن مدى(2–0.5) نانوغرام لكل غرام من الطعام (Rajkovic,2012) . هناك طرق متنوعة تم تطويرها للكشف عن السموم المعوية فمنها التي تعتمد على الاختبارات البيولوجية او الجزيئية. فضلاً عن العديد من الطرق المناعية الحساسة مثل والـ Enzyme– Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) والـ RadioImmunoassay (RIA) فضلاً عن تقنية(Reversed Passive Latex Agglutination Assay (RPLA والـ polymerase chain reaction (PCR) وحتى نظام الـ chromogenic macroarray له القابلية على الكشف عن السموم المعوية (Clarisse *et al.*,2013). هناك اهتمام كبير بموضوع المقاومة للمضادات الحيوية في العديد من دول العالم وذلك بسبب السلالات المقاومة للجراثيم الموجودة في البيئة وقابلية تلوث الطعام والماء بهذه السلالات المقاومة. وسجلت ان جرثومة الـ *S. aureus* لها القابلية على اظهار العديد من انماط المقاومة للمضادات الحيوية (Alian *et al.*,2012). تعد هذه الجرثومة من الممرضات المتقلبة للانسان حيث انها تطور مقاومتها لكل انواع المضادات الحيوية (Lozano *et al.*,2013). ان مقاومة هذه الجرثومة الممرضة للعديد من الادوية مستمرة وفي زيادة، وهناك القليل من السلالات الجرثومية التي تستجيب لبعض العلاجات بالمضادات الحيوية التقليدية (Chen *et al.*,2012) . حيث يعد علاج الاصابات الناتجة عن هذه الجرثومة فيه تحدي ومكلف لا سيما مع ازدياد نسبة اللاصابات المقاومة للمضادات الحيوية. وان خطورة هذه الجرثومة ليس بسبب انتشارها وامراضيتها فقط ولكن بسبب قابليتها على التغلب على المضادات الحيوية (Sina *et al.*,2013;Fratini, *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2015) .

يتأثر انتاج السموم المعوية بواسطة سلالات الجرثومة بالعديد من العوامل منها نوعية المغذيات ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة والضغط الجوي وكلوريد الصوديوم والمواد الكيميائية الاخرى فضلاً عن الاحياء المجهرية المنافسة(Zhang *et al.*, 2013;Solano *et al.*,2013).تنمو الجرثومة في درجة حرارة تتراوح بين (7–48) م°، وتنتج السموم المعوية عند الـ (10–48)م°، مع العلم ان درجة الحرارة المثلى لانتاج هذه السموم يقع بين درجة حرارة (40–45) م°.درجة الحموضة المثلى لإنتاج هذه السموم تقع ما بين (6.5–7.3)، تشير التقارير إلى أن الحد الأدنى من درجة الحموضة لانتاج السموم المعوية تقع عند

درجة حموضة 5.1 . ومع ذلك فان انتاج السموم المعوية يقاوم ظروف درجة الحموضة المنخفضة والتي تحطم بسهولة الجرثومة التي تنتج هذه السموم، وبالتالي تحافظ على فعاليتها في القناة الهضمية بعد ابتلاعها (Valero *et al.*,2009;Makita *et al.*,2012; Loir *et al.*,2003) .

هناك معلومات محدودة بشأن انتشار الجرثومة وانماط حساسيتها للمضادات الحيوية لا سيما السلالات المعزولة من العينات السريرية في العراق .تهدف هذه الدراسة الى تحديد معدل انتشار الجرثومة و مقاومتها للمضادات الحيوية وسمية العزلات الجرثومية المعزولة من العينات السريرية للانسان (الإسهال) في محافظة بابل. فضلاً عن تأثير العوامل البيئية مثل درجة الحرارة، ودرجة الحموضة على إنتاج السم المعوي B من قبل هذه الجرثومة، والتي لم يتم التحري عنها في دراسة سابقة.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص جرثومة الـ *S. aureus*

جمعت عينات الاسهال من المرضى الذين يعانون من اصابات التهاب المعدة ة والامعاء (الاسهال الحاد). حيث جمعت العينات ضمن مدة اربعة اشهر تقع ضمن شهر ايلول الى شهر كانون الاول لعام 2014 ، تم الحصول على 12 عزلة جرثومية تعود للنوع *S.aureus* من بين 175 عينة اسهال. حيث جمعت العينات من مستشفيات تقع ضمن محافظة بابل. جمعت المسحات الجرثومية من عينات الاسهال تحت ظروف معقمة، حيث لقحت هذه المسحات في انابيب اختبار تحتوي على وسط الـ tryptic soy broth (TSB) بحجم 10مليليتر. حضنت انابيب الاختبار عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، ثم اجري تخطيط من انابيب الاختبار على اطباق بتري تحتوي على وسط الـ Mannitol Salt Agar وحضنت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 36-24 ساعة. حيث ظهرت المستعمرات على شكل دائري واملس لامع (Sherein *et al.*,2009; Argudín *et al.*,2013). وشخصت جميع العزلات الجرثومية بالاعتماد على الاختبارات البيوكيميائية التقليدية . فضلاً عن العديد من الاختبارات البيوكيميائية الاخرى مثل اختبار الكاتاليز والاوكسيديز واختبار الاندول واحمر المثيل واختبار الـ Voges-Proskauer واختزال النترات واختبار الحركة واستهلاك السترات واليوريز وتكون الحامض من سكريات مختلفة فضلاً عن انتاج انزيم الـ thermonuclease (Vicosa *et al.*,2013). تم التأكد من تشخيص الجرثومة بواسطة استخدام شريط الـ API Staph system. وقد تم تخزين العزلات الجرثومية على وسط (TSB) المحتوي على الجليسيرول بنسبة 20% عند درجة حرارة -80م° (Zhang *et al.*, 2013) .

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية كل العزلات الجرثومية لعشرين مضاداً حيوياً باستخدام طريقة ال disc agar diffusion ـ على وسط الـ Mueller Hinton agar. وأقراص المضادات الحيوية (تركيز المضادات الحيوية بميكروغرام) هي كما يلي: teicoplanin (Tei) (30), tetracycline (Te) (30), gentamicin (Gm) (10), oxacillin (Ox) (1), methicillin (Met) (5), vancomycin (Van) (30), ampicillin (AmP) (10), clindamycin (C) (2), erythromycin (E) (15), penicillin (P) (10 IU), cephalotin (Cep) (30), kanamycin (K) (30), fosfomycin (Fos) (30), chloramphenicol (Chl) (30), trimethoprim (Tri) (2.5), fusidic acid (FA) (10), rifampicin (Rif)(5), Linezolid (Lzd)(30), ciprofloxacin (Cip)(5) and imipenem (I)(10) .(Udo *et al.*, 2006)

نقلت ثلاث مستعمرات من طبق البتري إلى انبوبة اختبار تحتوي على وسط ال Mueller Hinton broth ـ. تم تعديل كثافة اللقاح وفقا لعكورة انبوب مكفارلاند القياسي 0.5. ثم

تغمس مسحة من القطن في عالق اللقاح ومسح بها على كل سطح الأكار .بعد مرور مدة الحضانة عند 37م° لمدة 24 ساعة، وقد قيس قطر المنطقة حول القرص، ثم صنفت العزلات الى حساىسة او مقاومة متوسطة او مقاومة كما هو محدد في الـــ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . (Arslan and Özdemir,2012)

تحضير المستخلص الخام للسم المعوي B

زرعت العزلات الجرثومية في وسط مرق الـ brain heart-infusion (BHI) المجهز بخلاصة الخميرة بنسبة 1% وحضنت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 200 دورة/ دقيقة. تم الحصول على طافي المزروع الجرثومي من النبذ المركزي عند سرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة، ثم مرر هذا الطافي من مرشح غشائي ذات حجم مسام 0.45 ميكرومتر. استخدم هذا المحلول الرائق كمصدر للسم المعوي B (Can and Çelik, 2012).

الكشف عن السم المعوي B

حدد إنتاج السم المعويB حسب تقنية الـ reverse passive latex agglutination باستخدام عدة SET-RPLA التجارية وفقا لتوصيات الشركة المصنعة (Argud *et al.*,2012). باختصار، لقح حفر صفيحة صغيرة بـ 25 ميكرولتر من المحلول الرائق مع 25 ميكرولتر من الـ latex sensitized المضافة لها مضادات السموم المعوية . استخدمت السموم القياسية المقدمة من قبل الشركة المصنعة كمجموعة سيطرة موجبة واختبر حدوث او تواجد التفاعلات غير المرغوب فيها عن طريق إضافة 25 ميكرولتر من المحلول الرائق إلى 25 ميكرولتر من مجموعة السيطرة للـ latex . غطيت الصفائح بالسيلوفان وتم مجانستها باستخدام micromixer لمدة 3 دقائق . وبعد مرور مدة الحضانة لمدة 20 إلى 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، وسجلت النتائج وفقا للنمط التلازن agglutination الموصوف من قبل الشركة المصنعة . صنفت التفاعلات الموجبة الى درجات كالاتي (+) ،(++) ، و(+++) ، في حين فسر عدم تكون التلازن بالنتيجة السالبة (Cunha *et al.*,2006).

تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على انتاج السم المعوي B

زرعت الجرثومة على وسط اكار الدم blood agar وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م°، ومن هذا المزروع لقحت انابيب اختبار حاوية على وسط مرق الـ BHI بتركيز CFU108/مليلتر وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م°. اخذ العالق الجرثومي ولقحت به انابيب اختبار حاوية على وسط مرق الـ BHI وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجات حرارة مختلفة (5, 10, 15,20, 25, 30, 35, 40,45 ,50) م° وعند درجة حموضة ثابتة 7.4 ± 0.2 . كذلك أخذ العالق الجرثومي ولقحت به انابيب الاختبار الحاوية على نفس الوسط الزرعي وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجات حموضة مختلفة (3-11) وعند درجة حرارة ثابتة 37 م°. وتحققت قيم الرقم الهيدروجيني المطلوبة عن طريق تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط مرق الـ BHI (pH 7.4) باستخدام حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1M و هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.2M. وبعد مدة الحضانة المحددة تم عمل الطرد المركزي للعينات بسرعة 3500 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة، وجمع المحلول الرائق من العينات واعيد الطرد المركزي له لإزالة الخلايا المتبقية (Kristlova *et al.*, 2012). وقد استخدم هذا المحلول الرائق كمصدر للسم المعوي SEB.

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص العزلات الجرثومية

عزلت اثنا عشر عزلة جرثومية تعود للنوع *S. aureus* من مجموع 175 عينة اسهال، أي بنسبة عزل 6.7% . وشخصت جميع العزلات الجرثومية بالاعتماد على الاختبارات البيوكيميائية التقليدية الموضحة في (الجدول1). فضلاً عن صبغة غرام (موجبة للصبغة وهي على شكل مستدير غير مكونة للسبورات وتكون مفردة او على شكل ازواج او سلاسل قصيرة او تترتب في عناقيد غير منتظمة)، تمتلك الجرثومة فعالية حالة للدم من نوع الـ beta-hemolytic على وسط الـ sheep blood agar، ويكون لون المستعمرات عديم اللون الى الاصفر. اما بالنسبة للاختبارات البيوكيميائية تكون الجرثومة موجبة لانزيم الـ coagulase ومخمرة لسكر المالتوز وهذان الاختباران يميزان النوع *S. aureus* عن الانواع الاخرى التي تعود لنفس الجنس.

يعد الاسهال من العلامات المميزة لامراض الجهاز الهضمي الناتجة عن الجراثيم وفي بعض الاحيان تقترن بتغيرات التهابية تقرحية تحدث في الامعاء الدقيقة او الغليظة. ويعد الاسهال من المشاكل الخطيرة لانه يؤدي الى الهلاك او الموت بين الاطفال وحتى البالغين. يحتل الاسهال المركز الثاني بعد امراض الجهاز التنفسي كاحد المسببات الرئيسة للهلاك بين الامراض الملاحظة في بعض مدن العالم (Yah *et al.*,2007). يمثل النوع *S. aureus* ثاني مسبب للامراض المنقولة عن طريق الغذاء بعد انواع جنس الـ *Salmonella* (Medvedova *et al.*,2009). اشار الباحثان Flemming and Ackermann, (2007) الى نتائج مقاربة حيث عزلت جرثومة الـ *S. aureus* من مرضى يعانون من الاسهال بنسبة 7.3%. في حين اشار الباحث(Gebreselassie,2002) الى ان نسبة عزل الجرثومة كان 40.5% . بينما اشار الباحث Bhalla وجماعته (2007) الى ان نسبة عزل الجرثومة كان 4.2%. كذلك اشار الباحث Okolo وجماعته (2013) الى نسبة عزل هي 3.1%. فضلاً عن الباحث Yah وجماعته (2007) فقد سجل نسبة عزل هي 3.2%.

الكشف عن انتاج السم المعوي B

تم التحري عن قابلية جميع العزلات الجرثومية على إنتاج السم المعوي B باستخدام وسط مرق الـ (BHI)، وبالاعتماد على طريقة الـ reverse passive latex agglutination (RPLA). حيث اظهرت النتائج في (الجدول 2) الى ان من بين 12 عزلة جرثومية فقط ثمان عزلات (66.7٪) لديها القدرة على إنتاج السم المعوي SEB .

الجدول1. نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلات الجرثومية للـ *S. aureus* المعزولة من عينات الإسهال.

الاختبارات	النتيجة
انزيم الكاتالايز	+
انزيم الاوكسيديز	ـــــــ
انتاج الاندول	ـــــــ
اختزال السترات	+
احمر المثيل	+
فوكس بروسكاور	+
تحليل كريات الدم الحمراء	+
انزيم الكوئكيليز Coagulase	+
انزيم الثرمونيوكليز	+
القدرة على الحركة	ـــــــ
استهلاك السترات	ـــــــ
انزيم اليوريز	+
انتاج الحامض من السكريات	
الكلوكوز	+
المانيتول	+
المالتوز	+
اللاكتوز	+
الرافينوز	–
السكروز	+

تكون السموم المعوية مستقرة بالحرارة Heat–stable ، وهي المسبب الرئيس لالتهاب المعدة والأمعاء. وأفادت دراسات سابقة الاختلاف في انتشار الجرثومة وقابليتها على إنتاج السم المعوي B. على سبيل المثال، اشار الباحث Ataee وجماعته (2011) الى ان العزلات الجرثومية للـ *S. aureus* معزولة من العينات السريرية لها القابلية على انتاج السم المعوي B بنسبة 4 ٪. في حين عزلت الجرثومة من الابقار المصابة بالـ mastitis بنسبة 21.6٪(Al- Jumaily *et al.*,2014) ، فضلاً عن ان العزلات الجرثومية المعزولة من الاصابات الجلدية كانت لها القابلية على انتاج السم المعوي B بنسبة 25 ٪ (Imanifooladi *et al.*,2007) ، واشارت دراسة اخرى الى ان حوالي 50٪ من العزلات الجرثومية المعزولة سريرياً لها القابلية على أنتاج هذا السم (Ahanotu *et al.*,2006). يختلف انتشار العزلات الجرثومية المنتجة للسموم المعوية من العينات السريرية الإنسان بين الدراسات في بلدان مختلفة أو في

مناطق مختلفة من البلد نفسه. قد يكون سبب هذه الاختلافات يعود الى اختلاف العزلات بيئياً، وحساسية الطريقة المستخدمة للكشف عن السموم المعوية و الجينات وعدد العينات السريرية المستخدمة وانواعها في هذه الدراسات.

يمكن ان يخترق السم المعوي B بطانة الأمعاء والوصول إلى كل الأنسجة المناعية الموضعية والجهازية. ويفترض أن السم المعوي B يقوم بتنشيط الجهاز المناعي الموضعي مما يؤدي الى اضرار في القناة الهضمية فضلاً عن ان السم يقوم بتنشيط الخلايا البدينة. كذلك ينشط السم المعوي B إنطلاق بعض المواد المسؤولة عن التهابات مثل (الهستامين والليكوترين) أيضا مسؤولا عن اضرار الجهاز الهضمي (Ortega *et al.*,2012). وبالتالي، يجب أن تجهز مختبرات الأحياء المجهرية بالاختبارات التشخيصية للكشف عن هكذا سموم فضلاً عن تشخيص الجرثومة. وعليه يمكن تصميم أساليب جديدة لعلاج الاصابات بطريقة افضل، ومنع استخدام غير مبرر للمضادات الحيوية، ومنع ظهور المقاومة للمضادات الحيوية.

الجدول2: إنتاج السم المعوي SEB من العزلات الجرثومية للـ *S. aureus* المعزولة من عينات الإسهال.

العزلات	درجة التلازن
SA1	+
SA2	+++
SA3	————
SA4	+++
SA5	++
SA6	++
SA7	————
SA8	+
SA9	————
SA10	————
SA11	+++
SA12	+++

الحساسية للمضادات الحيوية

اختبرت انماط المقاومة للعزلات الجرثومية للـ *S. aureus* المعزولة من عينات الإسهال إلى 20 مضاداً حيوياً كما مبين في (الجدول 3). وقد اظهرت النتائج مقاومة عالية للعزلات الجرثومية لكلا المضادين الحيويين البنسلين والأمبيسلين وذلك بنسبة مقاومة 100٪. في حين أظهرت العزلات الجرثومية مقاومة لاربعة مضادات حيوية (التتراسيكلين والأوكساسيلين والميثيسيلين والاريثروميسين) بنسبة 66.7٪. وفضلاً عن ذلك أظهرت العزلات الجرثومية مقاومة للـ trimetheprim بنسبة 58.3٪. وقد لوحظت المقاومة المنخفضة للمضاد الحيوي الكليندامايسين بنسبة 41.7%. في حين أظهرت النتائج مقاومة للمضادين الحيويين الكانامايسين والسيبروفلاكسين بنسبة 33.3٪، بينما كانت مقاومة العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية التيكوبلانين و الكلورامفينيكول والإيميبينيم بنسبة 25٪. في حين اظهرت النتائج قليل من العزلات الجرثومية تكون مقاومة للجنتامايسين والفانكومايسين والريفامبيسين بنسبة 16.7 ٪. اظهرت

العزلات الجرثومية مقاومة منخفضة جداً للمضادات الحيوية السيفالوتين واللنزوليد والفوسفوميسين بنسبة 8.3٪. بينما كانت جميع العزلات الجرثومية حساسة لحامض الفوسيديك اي بنسبة 100٪.

يعتبر جنس الـ staphylococci من بين الاحياء المجهرية الموجبة لصبغة الجرام، هو الاكثر تكراراً في المقاومة المضادات الحيوية. و قد تطور جرثومة الـ *S. aureus* مقاومتها إلى مختلف المضادات الحيوية من طرق مختلفة (Arslan and Özdemir,2012). لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسات أخرى حيث تشير هذه الدراسات الى ان العزلات الجرثومية للـ *S. aureus* تكون غير مقاومة للـ methicillin (Shareef *et al.*,2009; Yan *et al.*,2012; Alian *et al.*,2012). وأظهرت العديد من الدراسات ان العزلات الجرثومية تكون حساسة للـ Vancomycin بنسبة ١٠٠% (Shareef *et al.*,2009; Pereira *et al.*,2009; Can and Çelik,2012; Argud *et al.*,2012; Alian *et al.*,2012; Sina *et al.*,2013). لا تتفق نتائج الدراسة مع دراسات أخرى اشارت ان العزلات الجرثومية تكون غير مقاومة للـ trimetheprim (Shareef *et al.*,2009; Argud *et al.*,2012). كذلك لا تتفق نتائج الدراسة مع دراسات أخرى تشير الى انه لا توجد مقاومة للـ ciprofloxacin (Pereira *et al.*,2009 ;Alian *et al.*,2012; Argud *et al.*,2012). ونتائج الدراسة لا تتفق مع دراسات أخرى اشارت الى ان جميع العزلات الجرثومية تكون حساسة للـ imipenem Arslan and (Can and Çelik,2012;،Özdemir, 2012). تتفق النتائج مع نتائج دراسة أخرى للباحثان Can and Celik,2012 الى ان 25 ٪ من العزلات الجرثومية المعزولة من الاجبان التركية تكون مقاومة للـ teicoplanin . في حين تختلف النتائج مع الدراسة نفسها التي تشير الى أن 25 ٪ و 33.3 ٪ من العزلات الجرثومية تكون مقاومة للـ tetracycline والـ clindamycin على التوالي. في حين أن جميع العزلات الجرثومية كانت حساسة للـ gentamicin . ومن جهة أخرى كانت 16.6 ٪ من العزلات الجرثومية مقاومة للـ oxacillin و methicillin . أيضا 50 ٪ من العزلات الجرثومية كانت مقاومة للـ ampicillin و erythromycin (Can and Çelik,2012).

لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي اشار اليها الباحث (Jaber,2011) حيث وجد أن 75 ٪ من العزلات الجرثومية تكون مقاومة للجنتاميسين. اشار الباحث Yan وجماعته (2012) الى أن 28.8 ٪، 96.2٪، 3.8٪ من العزلات الجرثومية المعزولة من العينات السريرية كانت مقاومة للاللتتراسيكلين والبنسلين والريفامبيسين على التوالي. بينما نتائج هذه الدراسة لا تتفق مع الباحث نفسه الذي لاحظ بان العزلات الجرثومية تكون مقاومة بنسبة اقل من 7.7 % لكل من الـ clindamycin والـ erythromycin (Yan *et al.*,2012). تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة أخرى للباحث Pereira وجماعته حيث اشار الى ان هناك نسبة ضئيلة من العزلات الجرثومية تكون مقاومة للجنتاميسين (Pereira *et al.*,2009). لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة أخرى للباحث Shareef وجماعته الذي وجدت ان 100٪ من العزلات الجرثومية المعزولة من الدجاج كانت حساسة للاللتتراسيكلين بينما كانت 80٪ من هذه العزلات مقاومة للالكلورامفينيكول(Shareef *et al.*,2009) . أظهر الباحث Sina وجماعته (2013) أن 25٪ من العزلات الجرثومية كانت مقاومة للأوكساسيلين. ان نتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج الباحث نفسه حيث أظهر أن جميع العزلات الجرثومية المعزولة من الاصابات الجلدية كانت مقاومة للبنسلين البنزيل، أيضا

تتفق النتائج الدراسة مع نتائج الباحث في ان الفوسفوميسين و حامض الفوسيديك كانا فعالين في القضاء على العزلات الجرثومية (Sina *et al.*,2013).

لا تتفق نتائج الدراسة مع دراسة للباحث (Ackermann *et al.*,2005) حيث اشار الى ان جميع العزلات الجرثومية المعزولة من الاسهال كانت حساسة للـ oxacillin. في حين تتفق نتائج الدراسة مع نتائج الباحث (Schlievert *et al.*,2010) وجماعته حيث اشار الى ان اكثر من 50 % من العزلات الجرثومية المعزولة من المستشفيات تكون مقاومة للـ methicillin. ان مقاومة العزلات الجرثومية للـ methicillin لا يعد العامل المباشر في زيادة فوعة جرثومة الـ *S aureus* ، ولكن يؤثر بطريقة غير مباشرة على انتاج عوامل الفوعة الاخرى للجرثومة، وبالتالي تكون السيطرة على الاصابات الناتجة من هذه الجرثومة اكثر صعوبة. وهناك دراسة تشير الى وجود عزلات جرثومية معزولة من المرضى تكون مقاومة للـ vancomycin. لاحظ الباحثان Arslan and Ozdemir,(2012) ان 93 % من العزلات الجرثومية المعزولة من عينات سريرية تكون حساسة للـ linezolid. لمنع الاستخدام غير الضروري للمضادات الحيوية من مجموعة الـ β–lactams والوصول الى العلاج الفعال يجب اولاً عزل الجرثومة وتحديد حساسيتها للمضادات الحيوية قبل البدء باي علاج(Bendahou *et al.*,2008) . ان استخدام المضادات الحيوية في علاج امراض الاسهال ساهم في الحد من هذه الامراض. ومع ذلك تبقى العزلات الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية من المشاكل المقترنة مع مرضى الاسهال والتي تشكل تحدي خطير. لذلك ندعو الى تنظيم استخدام المضادات الحيوية للحد من مقاومة هذه الادوية (Sina *et al.*,2013). تشير نتائج هذه الدراسة الى وجود مستويات عالية من المقاومة للمضادات الحيوية بين العزلات الجرثومية والتي تشير الى اهمية امراضية جرثومة الـ *S. aureus* ، ويمكن ان تساعد هذه النتائج في اختيار المضاد الحيوي المناسب للسيطرة على الاصابات البشرية وحتى البيطرية.

جدول 3 : الحساسية العزلات الجرثومية للـ *S. aureus* للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	العزلات الحساسة (%)	العزلات متوسطة (%)	العزلات المقاومة (%)
Teicoplanin	9 (75)	0	3 (25)
Tetracycline	4 (33.3)	0	8 (66.7)
Gentamicin	9 (75)	1 (8.3)	2 (16.7)
Oxacillin	2 (16.7)	2 (16.7)	8 (66.7)
Methicillin	4 (33.3)	0	8 (66.7)
Vancomycin	9 (75)	1 (8.3)	2 (16.7)
Ampicillin	0	0	12 (100)
Clindamycin	7 (58.3)	0	5 (41.7)
Erythromycin	2 (16.7)	2 (16.7)	8 (66.7)
Penicillin	0	0	12 (100)
Cephalotin	11 (91.7)	0	1 (8.3)
Linezolid	11 (91.7)	0	1 (8.3)
Kanamycin	8 (66.7)	0	4 (33.3)

0	1 (8.3)	11 (91.7)	Fosfomycin
3 (25)	1 (8.3)	8 (66.7)	Chloramphenicol
7 (58.3)	0	5 (41.7)	Trimetheprim
0	0	12 (100)	Fusidic acid
2 (16.7)	0	10 (83.3)	Rifampicin
4 (33.3)	0	8 (66.7)	Ciproflaxacin
3 (25)	0	9 (75)	Imipenem

تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في انتاج السم المعوي B

اظهرت النتائج ان درجة حرارة 20 م° كانت اقل درجة حرارة تم فيها انتاج السم المعوي B من قبل اربع عزلات جرثومية. في حين كانت درجة الحرارة 40 م° هي اعلى درجة حرارة اظهـرت فيهـا جميـع العزلات الجرثومية قابلتها على انتاج السم المعوي. بينما تمكنت ثلاث عزلات جرثوميـة فقـط (SA2 , SA12, SA11) من انتاج السم المعوي عند درجة حرارة 45م° (جدول 4). لوحظ ان اقل رقم هيدروجيني اظهر انتاج السم المعوي هو 4 في عزلتين جرثـوميتين فقـط همـا SA4, SA12 وان هـاتين العـزلتين الجرثوميتين لهما القابلية على انتاج السم المعوي حتى عند الرقم الهيدروجيني 10.5 (جدول 5).

جدول 4 : تأثير درجات الحرارة المختلفة على انتاج السم المعوي من العزلات الجرثوميـة للـ *S. aureus*

العزلات الجرثومية								درجة الحرارة (م°)
SA12	SA11	SA8	SA6	SA5	SA4	SA2	SA1	
–	–	–	–	–	–	–	–	5
–	–	–	–	–	–	–	–	10
–	–	–	–	–	–	–	–	15
+	+	–	–	–	+	+	–	20
+	+	–	+	+	+	+	–	25
++	++	+	+	+	++	++	+	30
+++	+++	+	++	++	+++	+++	+	35
++	++	+	+	++	++	+++	+	40
+	+	–	–	–	–	+	–	45

50	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ	ـــــــ

حدد انتاج السم المعوي بطريقة الـ RPLA. القراءات تمثل مكررين

يعتمد إنتاج السموم المعوية على العديد من العوامل الخارجية. وتشمل أهم العوامل الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة (Kristlová *et al.*,2012). أظهر الباحث (Rajkovic,2012) أن نمو جرثومة ال

S. aureus وإنتاج السموم المعوية يمكن أن يحدث عند درجة حرارة 22 م° و 37 م° و ولكن ليس في 12م°. سجل الباحث Valero وجماعته (2009) ان جرثومة الـ *S. aureus* تستطيع النمو عند الرقم الهيدروجيني 4.5 ، مما يدل على قدرة الجرثومة على ا لنمو تحت الظروف الحامضية. وأظهرت نتائج الباحث ان النمو الجرثومة كان أعلى عند الرقم الهيدروجيني 7 . ان نتائج الباحث لها اهمية خاصة في التنبؤ بإنتاج السموم المعوية، لأن الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى لإنتاج السموم المعوية عادة ما تكون أعلى قليلا من الدرجات المثلى لنمو الجرثومة. اشار الباحثان(Cunha and Calsolari,2008) الى ان إنتاج السم المعوي SEB للانواع الجرثومية السالبة لاختبار الـ coagulase-negative staphylococci (CNS) يحدث عند درجات حرارة وقيم الرقم الهيدروجيني المختلفة وكان معظم الإنتاج للسم المعوي عند درجة حرارة 39.4 م° وعند الرقم الهيدروجيني 7. وقد لاحظ الباحثان تثبيط انتاج السم المعوي عندما زيدت درجة الحرارة إلى 41م° وعند الرقم الهيدروجيني 4.5 . وفيما يتعلق بالرقم الهيدروجيني ، لاحظ الباحثان أن إنتاج السموم المعوية لا يحدث عند الرقم الهيدروجيني أعلى من 9 أو أقل من 5 ، وعند الرقم الهيدروجيني 8 ، لوحظ انخفاض في انتاج السم بنسبة 50 ٪ . وان الرقم الهيدجروجيني الامثل لإنتاج السم المعوي SEB هي 6.8.

وفي دراسة أخرى وجدوا ان انتاج السم المعوي يقع ضمن مدى من درجات الحرارة هو (35-45) م° (Schmitt *et al.*,1990). تشير نتائج هذه الدراسة الى ان انتاج السم المعوي من قبل الجرثومة لوحظ عند 45 م° ، ولكن عند درجة حرارة 50 م° لو يلاحظ إنتاج السم . لوحظ إنتاج السم المعوي SEB عند الرقم الهيدروجيني (4-10.5). وفضلاً عن ذلك، وجد الباحث Kristlova وجماعته (2012) ان الجرثومة تتمكن من النمو وانتاج السم المعوي من النوع SEH عند مدى من الرقم الهيدروجيني (4.3-10.6) . نتائج هذه الدراسة تشير الى أن درجة الحرارة العالية لها التأثير على إنتاج السم المعوي SEB اكثر من درجات حرارة الأقل من 20 درجة مئوية، حيث لم يلاحظ انتاج السم المعوي. لوحظ ان الجرثومة قادرة على انتاج السم المعوي SEB ضمن نطاق واسع من قيم الرقم الهيدروجيني، وهذا ما أكده الدراسات الاخرى على انواع اخرى من السموم المعوية . من نتائج هذه الدراسة نستنتج انه يجب معرفة المزيد عن السموم المعوية والعوامل التي تساهم في إنتاج هذه السموم وكذلك لمزيد من الفهم لخصائصها السمية.

جدول 5 : تأثير قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة على انتاج السم المعوي من العزلات الجرثومية للـ *S. aureus*

الرقم	العزلات الجرثومية

الهيدروجيني	SA1	SA2	SA4	SA5	SA6	SA8	SA11	SA12
3	–	–	–	–	–	–	–	–
3.5	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	+	–	–	–	–	+
4.5	–	+	+	–	–	–	+	+
5	–	+	++	+	–	–	++	+
5.5	–	+	++	+	+	–	++	+
6	+	+	++	+	+	+	++	++
6.5	+	+++	+++	++	++	+	+++	+++
7	+	+++	+++	++	++	+	+++	+++
7.5	+	+++	+++	++	++	+	+++	+++
8	+	+++	+++	++	++	+	+++	+++
8.5	+	++	+++	++	+	+	++	+++
9	–	+	++	+	+	–	+	++
9.5	–	–	++	–	–	–	+	++
10	–	–	++	–	–	–	+	++
10.5	–	–	+	–	–	–	–	+
11	–	–	–	–	–	–	–	–

حدد انتاج السم المعوي بطريقة الـــ RPLA. القراءات تمثل مكررين

References

Ackermann, G.; Thomalla, S.; Ackermann, F.; Schaumann, R.; Rodloff, A. and Ruf, B. (2005). Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic associated diarrhea. Journal of Medical Microbiology. 54: 149–153.

Adwan, G.M.; Abu-Shanab, B.A.; Adwan, K.M.; and Jarrar, N.R. (2006). Toxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolates from Northern Palestine. Emirates Medical Journal. 24(2): 1-3.

Ahanotu, E.; Alvelo-Ceron, D.; Ravita, T. and Gaunt. E. (2006). Staphylococcal Enterotoxin B as a Biological Weapon: Recognition, Management, and Surveillance of Staphylococcal Enterotoxin. Applied Biosafety. 11(3): 120-126.

Alian, F.; Rahimi, E.; Shakerian, A.; Momtaz, H.; Riahi, M. and Momeni, M. (2012). Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine, Sheep and Goat Raw Milk. Global Veterinaria. 8 (2): 111-114.

Al- Jumaily, E.F. ; Saeed, N.M. and Hussain H. 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**.**

Argud, M.A.; Mendoza, M.C.; Hevia, G.; Bances, M.A.; Guerra, M.B. and Rodicioa, R.M. (2012) Genotypes, Exotoxin Gene Content, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains Recovered from Foods and Food Handlers. Applied and Environmental Microbiology.78(8): 2930–2935.

Argudín, M. A.; Argumosa, V.; Mendoza, M.C.; Guerra, B. and Rodicio, M.R. (2013). Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible

Staphylococcus aureus from Spanish healthy carriers. Microbial Pathogenesis. 54: 26-33.

Arslan, S. and Özdemir, F. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from human and food against Linezolid, Quinupristin-Dalfopristin, Quinolones and Imipenem. African Journal of Microbiology Research. 6(11): 2616-2621.

Ataee, R.A.; Karami, A.; Izadi, M.; Aghania, A. and Ataee, M.H. (2011) Molecular Screening of Staphylococcal Enterotoxin B Gene in Clinical Isolates. Cell Journal (Yakhteh). 13(3): 187-192.

Bendahou, A.; Lebbadi, M.; Latifa Ennanei, L.; Essadqui, F. and Abid, M. (2008). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. J Infect Developing Countries. 2(3):218-225.

Bhalla, A.; Aron, D.C.and Donskey, C.J. (2007). *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of S. aureus on skin of hospitalized patients. BMC Infect Dis. 7: 105- 109.

Can, H.Y. and Çelik, T.H. (2012). Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. Food Control. 24: 100-103.

Chen, L.; Li, S.; Wang, Z.; Chang, R.; Jingliang Su, J. and Han, B. (2012). Protective effect of recombinant staphylococcal enterotoxin A entrapped in polylactic-co-glycolic acid microspheres against *Staphylococcus aureus* infection. Veterinary Research. 43:20-31.

Chiao, D.; Weya, J.; Tsui, P.; Lin, F. and Shyu, R. (2013). Comparison of LFA with PCR and RPLA in detecting SEB from isolated clinical strains of *Staphylococcus aureus* and its application in food samples. Food Chemistry. 141: 1789–1795.

Clarisse, T.; Michèle, S.; Olivier, T.; Valérie, E.; Vincent, M.; Jacques-Antoine, H.; Michel, G. and Florence, V. (2013). Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. Food Control. 32: 255-261.

Cunha, M.L.; Peresi, E.; Calsolari, R.A. and Júnior, J.P. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase- negative Staphylococcl isolated from foods. Brazilian Journal of Microbiology. 37:70-74.

Cunha,M.L.R.S. and Calsolari, R.A.O. (2008). Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. Microbiology Insights. 1: 13–24.

Danielsen, E. M. Gert H. Hansen, G.H. and Karlsdo, E. (2013). *Staphylococcus aureus* enterotoxins A2 and B: binding to the enterocyte brush border and uptake by perturbation of the apical endocytic membrane traffic. Histochem Cell Biol. 139:513–524.

Flemming, K. and Ackermann, G. (2007) Prevalence of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* in stools of patients with nosocomial diarrhea. Infection. 35: 356-358.

Fratini, F. Casella, S. Leonardi, M. Pisseri, F. Ebani, V. and 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.

Gebreselassie, S. (2002). Pattern of isolation of common gram positive bacterial pathogens and their susceptibilities to antimicrobial agents in Jimma Hospital. Ethiop Med J. 40: 115-127.

Imani, F.; Tavakoli, H.R. and Naderi, A (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iran. J. Microbiol. 2 (3) : 135-140.

Imanifooladi, A.A.; Sattari, M.; Peerayeh, S.N.; Hassan, Z.H. and Hossainidoust, S.R. (2007). Detection the *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from skin infections in hospitalized patients. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (3): 502-505.

Jaber, N.N. (2011). Isolation and biotyping of *Staphylococcus aureus* from white cheese in basrah local markets. Bas.J.Vet.Res.10(2): 55- 66.

Kristlová, J.; Jiříčková, P. and Vytřasová, J. (2012). Influence of pH and temperature on the production of staphylococcal enterotoxin H. African Journal of Microbiology Research. 6(11): 2598-2602.

Loir, Y.L. Baron, F. and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2 (1): 63-76.

Lozano, C.; Porres-Osante, N.; Julien Crettaz, J.; Rojo-Bezares, B.; Benito, D.; Olarte, I.; Zarazaga, M.; Sa´enz, Y. and Torres, C. (2013). Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. J Infect Chemother. 19:233–242.

Mainaa, E.K.; Hua, D.; Tsuji, T.; Omoec, K. and Nakanea, A. (2012). Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. International Journal of Medical Microbiology. 302 : 88– 95.

Makita, K.; Desissa, F.; Teklu, A.; Zewde, G. and Grace, D. (2012). Risk assessment of staphylococcal poisoning due to consumption of informally-

marketed milk and home-made yoghurt in Debre Zeit, Ethiopia. International Journal of Food Microbiology. 153:135–141.

Martins, N, Barros , L. Buelga, C. Silva, S. Henriques, M. and Ferreira, I. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. Food Chemistry**.** 167(15): 131–137.

Medveď ová, A.; Valík, L. and Studeničová, A. (2009). The Effect of emperature and Water Activity on the Growth of *Staphylococcus aureus*. Czech J. Food Sci. 27(2): 28-35.

Nada, H.A.; Gomaa, N.I.M.; Elakhras, A.; Wasfy, R. and Baker, R.A. (2012). Skin colonization by superantigen -producing Staphylococcus aureus in Egyptian Patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and serum interleukin-4 level. International Journal of Infectious Diseases. 16:29–33.

Nostro, A.; Cannatelli, M.A.; Musolino, A.D.; Procopio, F. and Alonzo, V. (2002). Helichrysum italicum extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. 35: 181–184.

Okolo, M.O.; Garba, D.E. and Stephen, E. (2013). Isolation and prevalence of bacteria associated with diarrhoea in children visiting hospitals in anyigba. American Journal of Research Communication. 1(8): 121-129.

Ortega, E.; Abrioue, H. and Galvez, A. (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins. 2(8): 2117-2131.

Pereira, V.; Lopes, C.; Castro, A.; Silva, J.; P. Gibbs, P. and Teixeira, P. (2009). Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology. 26:278–282.

Podkowik, M.; Park, J.Y.; Seo, K.S.; Bystron, J. and Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci.International Journal of Food Microbiology.163: 34–40.

Principato, M.A. and Qian, B. (2014). Staphylococcal enterotoxins in the Etiopathogenesis of Mucosal Autoimmunity within the Gastrointestinal Tract. Toxins. 6: 1471-1489.

Qiu, J.; Feng, H.; Lu, J.; Xiang, H.; Wang, D.; Dong, J.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, J. and Xuming Deng, X. (2010). Eugenol Reduces the Expression of Virulence-Related Exoproteins in *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology. 76 (17): 5846–5851.

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

Rajkovic, A. (2012). Incidence, growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in insufficiently dried traditional beef ham "govedja pr_suta"under different storage conditions. Food Control. 27: 369-373.

Rong-Hwa, S.; Shiao-Shek, T.; Chiao Der-Jiang,C. and Yao-Wen, H. (2010). Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. Food Chemistry. 118: 462–466.

Rosengren, A.; Fabricius, A.; Bengt Guss, B.; Sylvén, S. and Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. International Journal of Food Microbiology.144: 263–269.

Schlievert, P.M.; Strandberg, K.L.; Lin, Y.; Pharm, M.L. and Leung, D.Y. (2010). Secreted virulence factor comparison between methicillin resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 125(1): 39-49.

Schmitt, M.; Schuler-Schmid, U. and Scmidt-Lorenz, W. (1990). Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Int. J. Food Microbiol. 11: 1-19.

Shareef, A.M.; Mansour, R.S. and Ibrahim, K.K. (2009). *Staphylococcus aureus* in commercial breeder layer flocks. Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 23: 63-68.

Sherein, I.; El-Moez1, A.; Ahmed F.Y.and Ezzo, O. (2009). *Staphylococcus aureus* - A Cause of Fatal Toxic Shock Syndrome In Egyptian Horses (First record). Nature and Science. 7(7):79-87.

Sina, H.; Ahoyo, T.; Moussaoui, W.; Keller, D.; Bankolé, H.; Barogui, Y. Stienstra, Y.; Kotchoni, S.; Prévost, G. and Lamine 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- 193.

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.

Souza, E.L.; Barros, F.C.; Oliveira, C.E.V. and 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.

Spauldinga, A. R.; Linb, Y.; Merrimana, J. A.; Brosnahana, A.J.; Petersonb, M.L. and Schlievert a, P.M. (2012). Immunity to *Staphylococcus aureus* secreted proteins protects rabbits from serious illnesses. Vaccine. 30:5099–5109.

Udo, E.E.; Al-Sweih, N. and Noronha, B. (2006). Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals. Clin Microbiol Infect 2006. 12: 262–269.

Valero, A.; Pérez-Rodríguez, F.; Carrasco, E.; Fuentes-Alventosa, J.M.; García-Gimeno, R.M. and G. Zurera, G.(2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. International Journal of Food Microbiology. 133: 186–194.

Viçosa, G.N.; Loir, A.L.; Loir, Y.L.; Carvalho, A.F. and Nero, L.A.(2013). egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. International Journal of Food Microbiology. 165: 227–230.

Vieira, F.; Rodrigues, P.; Goncalves, A.; Menezes, R.; Aragao, S. & Sousa, V. (2001). Microbicidal effect of medicinal plant extracts (Psidium guajava linn. And Carica papaya linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 43(3):145-148.

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

Wu, S.; Duan, N.; Ma, X.; Xia, Y.; Wang, H. and Wang, Z. (2013). A highly sensitive fluorescence resonance energy transfer aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on exonuclease-catalyzed target recycling strategy. Analytica Chimica Acta. 782: 59– 66.

Wua, L.; Gao, B.; Zhang, F.; Sun, X.; Zhang, Y. and Li, Z. (2013). A novel electrochemical immuno sensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. Talanta. 106: 360–366.

Yah, C.S.; Chineye, H.U. and Eghafona, N.O. (2007). Multi-antibiotics-resistance plasmid profile of enteric pathogens in pediatric patients from Nigeria Biokemistri. 19(1):35-42.

Yan, X.; Wang, B.; Tao, X.; Hu, Q.; Cui, Z.; Zhang, J. Lin, Y.; You, Y.; Shi, X. and Grundmannc, H. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. Applied and Environmental Microbiology. 78(18): 6637–6642.

Yan, H.; Yi, H.; Xia, L.; Zhan, Z.; He, W.; Cao, J.; Yang, P. and Liu, Z. (2014). Staphylococcal enterotoxin B suppresses Alix and compromises intestinal epithelial barrier functions. Journal of Biomedical Science. 21:29.

Yarovinsky, T.O.; Mohning, M.P. Bradford, M.A.; Monick, M.M. and Hunninghake, G.W. (2005). Increased Sensitivity to Staphylococcal Enterotoxin B following Adenoviral Infection. Infection and Immunity. 73 (6): 3375–3384.

Zhang, C.; Shen, Y. and Dong, M. (2013). Distribution, polymorphism and temporal expression of egc in *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in China. Food Control. 29: 279-285.