Damascus University Journal
for the Basic Sciences
Vol 39 No.1 (2023): 93-109

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 1 (2023): 93-109

دراسة تأثير بعض الزيوت العطرية والصادات الحيوية على بعض عزلات جراثيم الليستيريا المستوحدة في الزجاج

د. بثينة الأشقر[1]

[1] مدرس، كلية العلوم، قسم علم الحياة النباتية، جامعة دمشق.

الملخص

تُعد الليستيريا المستوحدة، بإحداثها لحالات مميتة، من أهم أنواع الجراثيم ذات الإمراضية المتواترة؛ وأيضاً بدأت بمعاندة أصناف عديدة من الصادات الحيوية. من هنا تكمن أهمية عزل هذه الجراثيم من عينات سريرية بغية دراسة تأثير بعض الصادات الحيوية والزيوت العطرية التي تستعمل على نحو ناجح نسبياً أوربما إلى حد ما في الطب التقليدي. استُزرع 20 عينة من السائل الدماغي الشوكي ودموية لمرضى التهاب السحايا، التهاب الدماغ السحائي ولدى حديثي الولادة، على وسط PALCAM Agar؛ وبعد إدخال نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية على برمجية ABISonline، تبين أن 16 عزلة كانت لليستيريا مستوحدة (80%). تراوحت قيمة التركيز المُثبط الأدنى للصادات الحيوية والزيوت العطرية بين 0.5– 8 مكغ/مل؛ حيث كان الليفوفلوكساسين والزيت العطري للقرفة الأكثر تأثيراً.

الكلمات المفتاحية: الاختبارات الليفوفلوكساسين، فانكومايسين، القرفة، النارنج، مقاومة للصادات الحيوية.

حقوق النشر : جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Study of some oils extracts and antibiotics effects on some *Listeria monocytogenes* bacteria isolates *in vitro*

Buthaina AL-Ashkar[1]
[1] Department of Plant Biology – Faculty of sciences – Damascus university.

Abstract

Listeria monocytogenes, by causing deadly cases, is one of the most important types of bacteria with a high frequency of pathogens; these bacteria began to resistance many types of antibiotics. Hence the importance of isolating these bacteria from clinical specimens in order to study the effect of some antibiotics and essential oils that somehow have been used successfully in traditional medicine. Twenty samples of blood and the cerebrospinal fluid from adult and a newborn were cultured on PALCAM Agar media. After entering the biochemical results on the ABIS online software, it was revealed that 16 isolates were *L. monocytogenes* (80%). The minimum inhibitory concentration value (MIC) for antibiotics and essential oils was ranged between 0.5-8 µg/ml, and

Levofloxacin and cinnamon were the most efficient.

Key word: Levofloxacin, Vancomycine, *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, Antibiotic resistance

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a

CC BY- NC-SA

1- مقدمة ودراسة مرجعية:

تُعتبر جراثيم الليستيريا *Listeria* من أخطر الجراثيم الممرضة التي تنتقل عبر الأغذية والتي لها القدرة على مهاجمة نسج الإنسان وإحداث المرض (التهاب السحايا أو الإجهاض أو ...الخ) (أبو يونس وزملاؤها؛ 2005). وكان أول من أطلق عليها هذا الاسم الباحث Swann عام 1940، وذلك تكريماً للجراح البريطاني اللورد Joseph LISTERIA الذي كان أول باحث عمل عام 1860 حول مفهوم الجراحة المعقمة من أجل تجنب الانتكاسات الجراحية؛ إلا أن ظواهر الإصابات بهذه الجراثيم قد سجلت منذ عام 1929 كمرض يصيب الإنسان(Bell and Kyriakides, 2000)، يتبع جنس *Listeria* فصيلة الوتديات *Corynebacteriaceae*، وبينت الدراسات التصنيفية التي اعتمدت على الخصائص الفيزيائية والكيميائية (الجدار الخلوي، المورثات، الأحماض الأمينية)، وجود الأنواع التالية تابعة لجنس *Listeria* (1987Seeliger):

L. monocytogenes – L. innocua – L. ivanovii – L. seeligeri – L. welshimeri – L. gravi – L. murrayi

تبدو الجراثيم التابعة لجنس *Listeria* تحت المجهر عصوية الشكل، إيجابية الغرام، وهي غير مكونة للأبواغ، هوائية- لاهوائية اختيارياً، موجبة الكاتالاز، سالبة الأوكسيداز، ولا تطلق غاز ثنائي كبريت الهيدروجين H_2S، غير منتجة للإندول، تستطيع تحليل الاكزولين، ولا تستخدم أنواع السترات كمصدر للكربون(Wiedmann 2003)، وتحلمه معظم الأنواع المالتوز لتستخدمه كمصدر للطاقة (Jay, 1996)، في حين يستخدم النوعان *L .monocytogenes* و *L . innocua* الغلوكوز من جزيئة اللاكتوز فقط، حيث لا يستطيعان تخمير الغالاكتوز منها (Dameshvar et al., 1989).

يعتبر النوع *L. ivanovii* المسبب للأمراض عند الحيوان، بينما*L. Monocytogenes* هو النوع المسبب للأمراض عند الإنسان والحيوان، ولم يسجل أي حالة مرضية مرتبطة مع باقي الأنواع (CFSAN 2002). يتطلب نمو الليستيريا المستوحدة تواجد أربعة أنواع من الفيتامينات هي: الرايبوفلافين، البيوتين، الثيامين، البيروكسين، وكذلك تحتاج للأحماض الأمينية الأساسية: السيستئين، الغلوتامين، الإيزولوسين، الفالين، وتحتاج للشوارد Fe^{+3}، Mg^{+2}،Ca^{+2}،K^{+} (Chau and Shelef 1989).

تعتبر جراثيم الليستيريا المستوحدة من الأحياء المتطفلة اختيارياً، وتبدأ الأعراض بما يشبه الزكام مع تعب البسيط، بالإضافة إلى حمى، إعياء، توعك، غثيان، تقيؤ وإسهالات، وتسبب الإصابة عند النساء الحوامل إجهاضات مفاجئة أو ولادات لأجنة مشوهة، أما عند الأطفال فتعبر عن نفسها بأشكال مختلفة مثل التهابات السحايا، إصابة الجهاز العصبي المركزي، التهاب النخاع الشوكي، ضمور الدماغ بينما قد تؤدي إلى الوفاة عند المسنين، والأشخاص الذين يعانون من نقص في المناعة مثل مرضى السكري والإيدز والمرضى الذين يعانون من قصور كلوي (FDA 2002)، والأشخاص المصابين بالتليف الكبدي، ومرضى فشل القلب الاحتقاني(Bruhn *et al.,* 2007). وتختلف أعراض مرض Listeriosis تبعاً لحالة المضيف وكمية الغذاء المتناول.

إن الاستخدام الشائع، وغير المرشدغالباً، للصادات الحيوية يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة لهذه الصادات. كما أنها يمكن أن تكون مقاومة لأكثر من صاد حيوي، خاصة عند حدوث انتقال لبلازميدات مقاومة للصادات الحيوية. تُصَنَّف الإصابة بهذه الأنواع الجرثومية ضمن الأمراض الانتهازية، بمعنى أن حدوث أي تشويش في دفاع المضيف يؤدي إلى بدء نشوء المستعمرات الجرثومية ثم تطور الخمج، وغالباً ما تكون الإصابة بحاجة إلى تدخل الطبيب في المعالجة (المريري وزملاؤه، 2016).

تستخدم الزيوت العطرية والمستخلصات النباتية تقليدياً في الطب الشعبي لخصائصها كمضادات جرثومية، وأيضاً كمنشطات للجهاز المناعي (Inouyeetal., 2001; Shaabanetal., 2012). وحديثاً تم ترخيص العديد من الزيوت العطرية لحفظ الأغذية؛ ويتم دراستها لاستخدامها كبديل لعلاج الأحياء الدقيقة المقاومة للعديد من الصادات الحيوية سواء في الطب البشري أو الطب البيطري. (Wińska et al., 2019; Man et al., 2019)

تنتج الزيوت العطرية الأساسية مواد عضوية كمستقلبات metabolomics ثانوية لها دور في تثبيط الأحياء الدقيقة بما في ذلك الجراثيم سالبة وموجبة الغرام والفطريات والفيروسات (Akhtaretal., 2014; SwamyandSinniah, 2016)؛ حيث تحوي العديد من المواد العضوية المثبطة للأحياء الدقيقة (Arumugam *et al.*, 2016). على الأغلب تبدو جراثيم موجبة الغرام أكثر تثبيطاً بواسطة

الزيوت العطرية من سالبة الغرام (Man *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). وللزيوت العطرية تأثير مُثبط واسع الطيف على العديد من العوامل المُسببة لفساد الأغذية لذا يمكن استخدام الزيوت الأساسية كعوامل مُنكهة في صناعة الأغذية كما يمكن للزيوت أن تندمج في المنتجات الغذائية من أجل تمديد صلاحيتها (Li *et al.*, 2019).

تسبب الليستيريا مشاكل صحية واقتصادية كبيرة جداً في سورية(Al-Mariri et al., 2013)، إذ أنها تُعْتَبَر من الأمراض الهامة المشتركة بين الإنسان والحيوان (أبقار، دواجن، أغنام)، وقد تسبب بعض المعالجات غير المحسوبة للقطعان أو الإنسان، حدوث مقاومة شديدة ضد الصادات التي تستخدم عادةً في علاج هذه الجراثيم(المريري و رمضان،2014). لذا نعتقد بأن القيام بعملية اختبار حساسية الجراثيم لبعض الصادات وبعض مستخلصات الزيوت النباتية هاماً ومساعداً لنافي الجهود الرامية لاجتثاث هذه الجراثيم، وتحديد الدواء الأنجع للقضاء عليها.

2- مواد البحث وطرائقه:

2-1- الاعتيان وشروط النمو:

2-1-1- الاعتيان:جُمعت 20 عينة من بعض مستشفيات دمشق (المواساة، الأسد الجامعي، دمشق، دار التوليد)، من سائل دماغي شوكي ودموية لمرضى التهاب السحايا، والتهاب الدماغ السحائي ولدى حديثي الولادة، وذلك خلال الفترة الواقعة بين كانون الثاني 2018 وشباط 2019، وقد تم حفظ العينات في الدرجة 4 مئوية حتى وصولها إلى المختبر حيث تم البدء بالعمل عليها فور وصولها.

2-1-2- شروط النمو: تم التعامل مع العينات حسبالمواصفة القياسية1129 SR EN I50 حيث تم الإغناء الأولي للعينات بعد مجانستها في وسط سائل وحضنت درجة حرارة 30°س لمدة 24 ساعة، ومن ثماستُزرعت العينات على وسط PALCAM Agar ثم تم حضنها لمدة 18 ساعة بالدرجة 37°س (المريري وأبو يونس؛ 2009).

2-2- صبغة غرام:

أُجري تلوين غرام على عزلات الليستيريا بُغية التوصيف الشكلي للجراثيم المدروسة ودراستها تحت المجهر.

2-3- الاختبارات الحيوية الكيميائية:

أُجريت التجارب في هيئة الطاقة الذرية السورية، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، مخابر دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات، حيث أُخذت مستعمرات جرثومية نقية من أطباق البتري وحُلت بحجم 1 مل من الموقي الملحي الفوسفاتي PBS لتحضير معلق جرثومي ومن ثم تم تحديد التعداد الجرثومي بواسطة جهاز المطيافية على طول موجة 590 نانو متر؛ وضُبط التعداد على 2x 10^7cfu/ml. أُخذ حجم 50 مكل من كل مُعلق للمستعمرة الجرثومية وأُضيف إلى حجم 150 مكل لكل كاشف على صفيحة المعايرة الدقيقة (96 بئر). تمت تغطية الصفائح وحُضنت لمدة 24 ساعة بالدرجة 37°س، ثم أُضيفت بعض الكواشف وتمت قراءة النتائج بالاستعانة ببرمجية BacterialIdentificationSoftware(ABIS-online) Advanced على موقع Regnum Prokaryotae.

2-4- تقنية PCR:

تم إجراء تفاعل التسلسل التضخيمي PCR على مرحلتين المرحلة الأولى من أجل استحصال المادة الوراثية DNA، وذلك على سائل بكتيري بعمر 24 ساعة، حيث أُخذ1.5 مل منه وتم تثفيله لمدة 20 ثانية بسرعة 9000 دورة/دقيقة، بعد ذلك تم التخلص من الطافي، وأضيف - فوق الراسب- 500 مكل من موقي TE و(Tris - HCl 10mM + 1mM EDTA, pH = 8)، ثم أضيف 50 مكل من أنزيم ليزوزيم 10 مغ/مل، وترك لمدة ساعة بحمام مائي درجة حرارته 37°س مع الهز، ثم نقل الأنبوب إلى حمام مائي بدرجة حرارة 50°س مع الهز حيث ترك لمدة 5 ساعات. وبعد انتهاء المدة المطلوبة، أضيف 25مكل من بروتيناز K تركيز 20 مغ/مل،

ومن ثم ترك الأنبوب بحمام مائي رجاج حرارته 37°س لمدة ساعة. أضيف بعد ذلك 25 مكل من SDS تركيز 25%، وتم إعادة الأنبوب إلى حمام مائي درجة حرارته 37°س لمدة 1 ساعة. وبعد مرور الساعة، أضيف 200مكل من NaCl (5 مول) وتم تحريك الأنبوب بلطف عدة مرات، ثم أضيف 750 مكل من فينول – كلوروفورم، وثفل لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة المخبر بسرعة 13000 دورة/دقيقة، ومن ثم نقل الطافي إلى أنبوب ابندورف أخر، وأضيف له 450 مكل إيزوبروبانول، ثم تمت إعادة عملية التثفيل لمدة 45 دقيقة بسرعة 13000 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة المخبر. تم التخلص من الطافي، ووضع للراسب 1 مل من الإيثانول 70% بارد، ومن ثم تم إجراء عملية التثفيل على سرعة 13000 دورة/دقيقة بدرجة 4°س، ثم تم التخلص من الطافي وترك الراسب ليجف. بعد تمام جفاف الراسب، أضيف له 100مكل من TE للتخفيف، وتم حفظ الـDNA بدرجة حرارة –20°س.

أما المرحلة الثانية، فهي مرحلة إجراء تفاعل الـ PCR، وذلك بتحضير مزيج بحجم 25 مكل يحتوي على 2 مكل من معلق الـDNA، بالإضافة إلى 1.5مكل من موقي التفاعل reaction buffer، 3 مكل من $MgCl_2$ (25nm)،0.5 مكل من dNTP، 1مكل من المرئسات (الجدول 1) (Al-Mariri *et al*., 2013)، النوعية لنوع الليستيريا المستوحدة، و0.2 مكل من DNA polymerase، ويُتمم الحجم باستخدام ماء مقطر.

يعتمد تفاعل التسلسل التضخيمي PCR على عدة مراحل هي: مرحلة التمسخ الأولي على الدرجة 92°س لمدة 5 دقائق لدورة واحدة، ثم 35 دورة تتألف كل منها من 3 مراحل: مرحلة التمسخ Denaturation (94°م لمدة 30 ثانية)، مرحلة الالتحام Annealing (50°م لمدة 30 ثانية)، مرحلة الاستطالة Extension (72°س لمدة 30 ثانية)، وفي نهاية البرنامج حُضنت المحتويات على الدرجة 72°س لمدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية (Final extension)، وحُفظت نواتج التفاعل على الدرجة 4°س. فُصلت نواتج التفاعل على هلام أغاروز(Agarose gel) تركيزه 1.5% في محلول (TAE 1X) والمضاف له 3مكل من بروميد الإيتيديوم ضمن محلول موقي (TAE 1X)، وأُستخدم جهاز الرحلان الكهربائي بجهد (فرق كمون) 85 فولط، وشدة تيار 150 أمبير لمدة ساعة، ثم دُرست الحزم المتشكلة باستخدام جهاز ماسح الهلامة.

الجدول (1). المرئسات المستخدمة في الدراسة

التسلسل	النوع البكتيري	تتالي المرئسة'3-'5
1	*L. monocytogenes*	CCGTGCGCCCTTTCTAACTT
		TTTGTTCAGTTTTGAGAGGT

2-5- جمع العينات النباتية:

تم جمع عينات من النباتات خلال فصل الإزهار من مناطق مختلفة من سوريا بين شهري نيسان وحزيران من عام 2019، أو تم شراؤها من السوق المحلية (الجدول 2)، والنباتات هي:

أوكالبتوسكمالدولي (*Eucalyptuscamaldulensis*) (Brooker and slee., 2019)، إكليل الجبل (*Rosmarinusofficinalis*)، سرو عطري (*Cupressus Macrocarpa*)، القرفة *Cinnamomum verum*)، والنارنج (*Citrus aurantium*)(GRIN, ARS and USDA., 2010). وتم تنظيف العينات من أيِّ نباتات غريبة ومن الغبار أو أيِّ ملوثات أُخرى.

الجدول (2). النباتات وفصائلها، أماكن الجمع والأجزاء المُستخدمة

النبات	الاسم العلمي	الفصيلة	موقع الجمع	الارتفاع (م)	زمن الجمع	الجزء المستخرج
اكليل الجبل	*Rosmarinus officinalis L.*	الشفوية	اللاذقية	300	حزيران	الأجزاء الهوائية
النارنج	*Citrus aurantium L.*	السذابية	اللاذقية	300	نيسان	الأزهار
أوكالبتوسكمالدولي	*Eucalyptus camaldulensis*	الآسية	طرطوس	300	حزيران	الفروع المزهرة
سرو عطري	*Cupressus Macrocarpa*	السروية	ريف دمشق	800	حزيران	الأوراق
القرفة	*Cinnamomum verum*	الغارية	دمشق، سوق بزورية	–	حزيران	لحاء الشجرة

2-6- استخلاص الزيوت العطرية:

تم جمع وتخزين الزيوت العطرية المستخلصة بطريقة الفصل ببخار الماء باستخدام جهاز Clevenger-type وذلك من الأجزاء الهوائية، الأزهار، الأوراق،لحاء الشجرة وذلك باستخدامها طازجةً بعد القيام بتنظيفها ووزنها (Al-Mariri and Safi, 2013). ومن ثم تم تجميع الزيت العطري ضمن زجاجيات محكمة الإغلاق وتم حفظها في البراد. ومن أجل إجراء فحص الفعالية المضادة للميكروبات، تم إجراء عدة تمديدات للزيت باستخدام الديميثيل سولفوكسايد DMSO.

2-7- طريقة انتشار القرص The disk diffusion method:

تم إجراء اختبار الحساسية باستخدام 8 صادات حيوية (Oxoid)، بالتراكيز التالية:

10 مكغ أمبيسللين، 30 مكغ أموكسيسسلين؛ 10 مكغ ليفوفلوكساسين، 30مكغ أميكاسين، 10 مكغ/مل جنتاميسين، 5 مكغ سيبروفلوكساسين، 30 مكغ دوكسي سيكلين و10 مكغ فانكومايسين. كما تم إجراء الاختبار باستخدام 10 مكل من كل من الزيوت العطرية المستخلصة سابقاً، وتم تفسير النتائج وفقًا لمعايير CLSI، 2006.

2-8- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للصادات:

في سبيل تقدير الحساسية للصادات، تم إتباع طريقة well broth microdilution وذلك باستخدام صفيحة ذات 96 بئراً (TPP سويسرا). تم تمديد الصادات لمرتين في وسط Broth Infusion Heart Brain وتلقيح الآبار باستخدام تعداد10^6cfu من الجراثيم (بحجم نهائي 0.2 مل) حسب طريقة (Al-Mariri and Safi., 2013). وتم إنجاز اختبار التركيز المثبط الأدنى وفقاً لتعليمات لجنة المعايير المخبرية السريرية الدولية CLSI.

تم استخدام مدروج تراكيز لكل صاد يتراوح بين 0.064 و15.36 مكغ/مل وأجريت جميع الاختبارات ثلاث مرات، ثم تم أخذ المتوسط. كما واستخدمت الصادات التالية: سيبروفلوكساسين (Ciprofloxacin)، دوكسي سكلين (Doxycycline)، فانكومايسين (Vancomycine)، ليفوفلوكساسين (Levofloxacin)، أموكسيسسلين (Amoxicline)،أميكاسين (Amkacine)، جنتاميسين (Gentamycin) وأمبيسلين (Ampicillin). وتم تحضير الشاهد الإيجابي دون إضافة الصادات، والشاهد السلبي دون إضافة الجراثيم.

2-9- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للزيوت العطرية:

اتبعت طريقة microdilutionbroth، بتحضير ثلاث مكررات للتمديدات المتسلسلة لكل زيت عطري في وسط Nutrientbroth ضمن صفائح ذات 96 بئراً باستخدام تراكيز لكل زيت عطري تتراوح بين 0.03 و1 مكل/مل حسب طريقة (Al-Mariri et al., 2013). واعتبر أخفض تركيز أدى لتثبيط نمو 50% أو 90% من الجراثيم على أنه التركيز المثبط الأدنى MIC_{50} أو MIC_{90} على التوالي.

2-10- التحليل الإحصائي:

تم إجراء التحليل الإحصائي لتقييم التراكيز المثبطة المُثلى لأكثر الصادات الحيوية أو الزيوت العطرية فعاليةً باستخدام ProbitAnalysis (SPSSInc. 2010). بمستوى أهمية $p<0.05$ (مستوى ثقة 95٪).

3- النتائج:

3-1- تحديد هوية الليستيريا باستخدام الطرائق الحيوية الكيميائية:

أظهرت نتائج التلوين بصبغة غرام لعزلات الليستيريا المأخوذة من مستعمرات نقية أن خلاياها كانت موجبة الغرام، عصوية صغيرة، مفردة أو متوضعة في سلاسل صغيرة.

أظهرت نتائج الدراسة أن جميع عزلات الليستيريا موجبة الكاتالاز، أحمر الميتيل وفوكس بروسكار Voges-Proskauer وسالبة الأوكسيداز ولا تحلمه اليوريا؛ ولا تنتج غاز كبريت الهيدروجين H_2S، وهي غير مُنْتِجة للإندول. وعند إجراء اختبار الحركة عن طريق الزراعة على بيئة SIM في الدرجة 25 درجة مئوية، تبين أنها جراثيم متحركة (الجدول 3)، كما أن لها القدرة على إنتاج الإنزيم الحال للدم عند استنباتها على وسط استنبات الليستيريا الحاوي على 5% من دم الغنم.

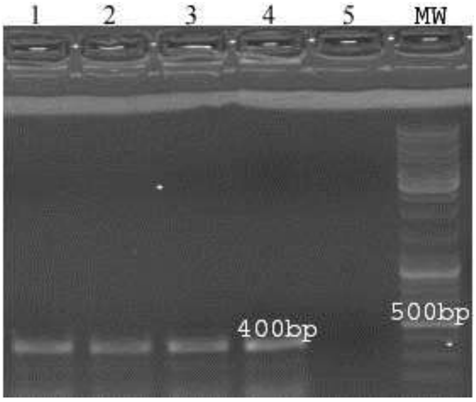
الجدول 3: نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية لليستيريا المستوحدة

1	Beta-hemolysis	+	9	Indole	−	17	Galactose	−	25	Sucrose	+
2	Growth at 37°C	+	10	H_2S	−	18	Glucose	+	26	Starch	− +
3	Motility at 25°C	+	11	Urea	−	19	Glycerol	−	27	Trehalose	+
4	Peptone water + 10% NaCl	+	12	Gelatine	−	20	Lactose	+	28	Xylose	−
5	Catalase	+	13	Esculine	+	21	Maltose	+	29	Voges-Proskauer	+
6	Oxidase	−	14	Citrate	−	22	Mannitol	-			
7	MR	+	15	Nitrate	−	23	Raffinose	−			
8	VP	+	16	Arabionose	−	24	Sorbitol	+			

بعد ذلك تمت مطابقة نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية بوساطة برمجيةABIS online وأوضحت نتائج المطابقة على البرنامج المذكور وجود تطابق بنسبة 94.5% مع الليستيريا المستوحدة وتوافقت مع دليل بيرجي وأغلب الدراسات العالمية (Cappucino, 2002; Kannan, 2002; Holtand Krieg,2000). جُمعت 20 عينة من بعض مشافي دمشق (المواساة، الأسد الجامعي، دمشق، دار التوليد)، وحسب الصفات الشكلية والاختبارات الحيوية الكيميائية تبين أن من بينها 16عزلة من الليستيريا المستوحدة: 3عزلات من مشفى دمشق و4 من مشفى الأسد الجامعي و7 من المواساة و2 من دار التوليد.

3-2- تقانة PCR لتنميط الليستيريا:

يُظهر الشكل 1 تنميط الليستيريا المعزولة من العينات المشمولة في هذه الدراسة، باستخدام مرئسات نوعية لكل نوع. يُوضح الشكل 1 أننا استطعنا تضخيم مورثة ذات وزن جزيئي400 أساس آزوتي (العصابة 2) وهي توافق الشاهد الموجب الليستيريا المستوحدة *L. monocytogenes* العيارية.



الشكل 1: المسار MW: واسم جزيئي معياري بقياس 100 bp، المسار 1: عينة سائل دماغي شوكي، المسار 2: عينة دموية، المسار 3: عينة من حديثي الولادة؛ المسار 4: عينة عيارية؛ المسار 5: شاهد سلبي.

3-3- اختبار الحساسية للصادات الحيوية والزيوت العطرية:

يُوضح الجدول 4 أن أفضل تأثير مثبط ضد عزلات الليستيريا المستوحدة كان للأمبيسللين، الليفوفلوكساسين والفانكومايسين حيث تراوح هالات التثبيط من 16-20 مم. بينما كان هناك تأثيراً طفيفاً للسيبروفلوكساسين على العزلات الجرثومية المستخدمة في الدراسة. وضمن شروط تجربتنا لم نجد أي تأثير مثبط للصادات الحيوية أموكسيسيللين، دوكسي سكللين وأميكاسين وجنتاميسين على 16 عزلة ليستيريا المستوحدة المعزولة من بعض العينات السريرية.

الجدول 4. هالات التثبيط (مم) لـ 8 صادات حيوية ضد عزلات الليستيريا المستخدمة في الزجاج.

الصاد الحيوي	مدى هالات التثبيط (مم)
Ampicillin	16-18
Ciprofloxacin	13-15
Amoxicillin	8-10
Levofloxacin	17-19
Doxycycline	5-7
Amikacin	0
Gentamycin	10-11
Vancomycin	18-20

كان للزيت العطري للقرفة تأثيراً مثبطاً على عزلات الليستيريا المستوحدة (هالات التثبيط 20- 22مم)؛ ولأكليل الجبل تأثيراً متوسطاً (هالات التثبيط 15-16مم)؛ بينما كان تأثيراً طفيفاً للزيوت العطرية للنارنج، كينا اللاذقية والسرو العطري (الجدول 5).

الجدول 5. هالات التثبيط (مم) لـ 5 زيوت عطرية ضد عزلات الليستيريا المستخدمة في الزجاج.

الزيت العطري	مدى هالات التثبيط (مم)
القرفة	20-22
النارنج	5-7
كينا اللاذقية	10-11
سرو عطري	7-9
اكليل الجبل	15-16

3-4- التأثير المثبط الأدنى للصادات الحيوية والزيوت العطرية:

يبين الجدولان (6 و7) التأثير المثبط الأدنى لـ 50% من العزلات (MIC_{50}) والتأثير المثبط الأدنى لـ 90% من العزلات (MIC_{90}). أجْرِيَت التجربة بمكررين لكل عزلة، وأُخذ متوسط المكررين، ومن ثم تم أخذ متوسط العزلات لكل سلالة جرثومية على حِدا. واعتبر

انخفاض التعداد حتى 50% من التعداد البدئي دليلاً على تثبيط 50% من الجراثيم، وانخفاضه حتى 10% دليلاً على تثبيط 90% من الجراثيم. تراوحت قيم التركيز المُثبط الأدنى MIC_{50} للصادات الحيوية بين 4-0.5 مكغ/مل والـ MIC_{90} بين 8-1 مكغ/مل؛ حيث كان الليفوفلوكساسين والفانكومايسين الأكثر تأثيراً بينما الأقل تأثيراً السيبروفلوكساسين (الجدول 6). وكانت جميع عزلات الليستيريا المستوحدة مقاومة للأموكسيسيللين، دوكسي سكللين وأميكاسين وجنتاميسين.

الجدول 6. التركيز المثبط الأدنى لـ 8 صادات حيوية ضد عزلات الليستيريا المستوحدة المستخدمة في الزجاج.

الصاد الحيوي	MIC_{range} ($MIC_{50\%}$ - $MIC_{90\%}$) (مكغ/مل)
Ampicillin	1-2
Ciprofloxacin	4−8
Amoxicillin	ND
Levofloxacin	0.5-1
Doxycycline	ND
Amikacin	ND
Gentamycin	ND
Vancomycin	0.5-1

ND: لا يوجد تأثير.

يُوضح الجدول 7 تأثيراً جيداً للزيت العطري للقرفة وإكليل الجبل على عزلات الليستيريا المستوحدة حيث تراوح التركيز المثبط الأدنى MIC_{50} بين 0.5 − 1 مكل/مل؛ والـ MIC_{90}بين 2 − 4 مكل/مل؛ وتأثيراً متوسطاً نسبياً للزيتين العطريين كينا اللاذقية والسرو العطري حيث تراوح التركيز المثبط الأدنى MIC_{50} والـ MIC_{90} بين 4−8 مكل/مل على التوالي؛ بينما لم يُلاحظ أي تأثير للزيت العطري للنارنج ضمن شروط دراستنا.

الجدول 7.التركيز المثبط الأدنى لـ 5 زيوت عطرية ضد ضد السلالات الجرثومية المستخدمة في الزجاج

الزيت العطري	MIC_{range} ($MIC_{50\%}$ - $MIC_{90\%}$) (مكغ/مل)
القرفة	0.5−2
النارنج	ND
كينا اللاذقية	4-8
سرو عطري	4-8
اكليل الجبل	1-4

ND: لا يوجد تأثير.

حيث يلاحظ من الجدول 6 أن زيت القرفة هو الأفضل تأثيراً يليه زيت إكليل الجبل بالمقارنة مع الزيوت الأخرى بدلالة إحصائية معنوية (p<0.05).

4− المناقشة:

تصيب الليستيريا المستوحدة الإنسان والحيوانات الأهلية، لهذا فإن الإنسان يُصاب بهذه الجراثيم نتيجةً لتناوله منتجات الحليب الملوثة أو اللحم الملوث، وبالتالي فهي تسبب خسائر اقتصادية وصحية. لذا يُلاحظ وجود رد مناعي غريزي ضدها عند أغلب البشر والحيوانات، حتى أن الأضداد تنتقل من الأم إلى المولود عبر الحليب. هناك عوامل عديدة تسمح للجراثيم بالتغلب على الجهاز المناعي نذكر منها: الحالة الفيزيولوجية للفرد، والعمر (حيث يكثر احتمال الإصابة عند صغار السن)، والنظام الغذائي الملوث، والماء الملوث، والاستجابة المناعية للفرد، و/أو موسم الإصابة (Leekha et al., 2011).

تحتاج معالجة داء الليستيريا البشري لاستخدام صادات قادرة على اختراق البالعات الكبيرة والعمل ضمن البيئة داخل الخلوية الحامضية. وبالرغم من التشخيص والعلاج الجيدين، تنشأ العديد من السلالات المقاومة للأدوية المضادة للميكروبات، مؤديةً لفشل المعالجة (Aarnisalo et al., 2007). وقد تطورت سلالات عديدة من الليستيريا مقاومة للعديد من الأدوية. لذا، فيبدو أنه من

الضروري البحث عن عوامل جديدة مضادة للميكروبات قادرة على العمل ضد السلالات المقاومة، الأمر الذي قد يؤدي للحد من حالات النكس أو حتى شفاء المرض. وفي هذا السياق، يبدو أنَّ النباتات الطبية، التي تملك تأثيرات جانبية محدودة والأقل ثمناً من الأدوية، تستطيع أن تكون بديلاً جيداً.

يُستخدم في معالجة إصابات الليستيريا المستوحدة الصادات الحيوية التالية: الأمبيسللين أو البنسللين مع جنتاميسين أو أميكاسين وقد يُستخدم السيبروفلوكساسين والليفوفلوكساسين، أما المرضى الذين لديهم حساسية من البنسيللينيات يُعالجوا باستخدام الفانكومايسين مع جنتاميسين أو الدوكسي سكللين مع أميكاسين (Gerner-Smidt et al., 2005).إلا أن حساسية جراثيم الليستريا تختلف باختلاف نوعية الصاد، كما أنها تتميز بمقاومتها لهذه الصادات بعد استخدامها لعدة مرات.

حتى الآن قليلة هي الدراسات التي حددت مقاومة الليستيريا للصادات الحيوية في بلدنا. منها دراسة منشورة في مجلة أكساد أظهرت فيها بعض المستخلصات النباتية نتائج تثبيطية إيجابية على جميع أنواع البكتيريا المستخدمة ومنها الليستيريا (ACSAD, 2021)؛ وتثبيط البكتريوسين–أ (Enterocin A) المنتج من العزلة المحلية*Enterococcus feacium* AA3 لجراثيم الليستيريا المستوحدة الملوثة تجريباً للجبنة البلدية (المريري وزملاؤه؛ 2016)؛ كما وجد المريري وزملاؤه (2013) تأثيراً تضادياً لجراثيم حمض اللبن المعزولة من الجبن الأبيض البلدي على اليستيريا المستوحدة.

في دراستنا ورغم قلة عدد العزلات السريرية المُختبرة؛ نعتقد أنها من الدراسات النادرة حول جراثيم الليستريا لتحديد حساسية الليستيريا والمعزولة من العينات السريرية؛ لأننا لم نستطع جمع عدد أكبر من العينات من المشافي وذلك لقلة عدد مرضى مرض الليستيريا الذين يذهبون للمستشفيات كما أن اغلب المرضى يعتقدون أنها أعراض حمى طفيفة وأنه يمكن أن تتم المعالجة في المنزل أو ضمن عيادات خاصة لذلك فإن بعض الحالات غير مشخصة ولا تدخل ضمن الإحصائيات أو المعالجات المطلوبة كما أن عمليات الاجهاض التي تحدث لا يتم تبيان أسبابها والتي من الممكن أن تعود للتلوث ببكتيريا الليستريا.

من 20 عينة لمرضى كانت تبدو عليهم أعراض داء الليستيريات المستوحدة؛ فقط 16 عينة تم تأكيد أنها تتبع نوع الليستيريا المستوحدة باستخدام الاختبارات الحيوية الكيميائية وتقانة الـ PCR مما يؤكد أن استخدام طرائق الاستزراع على وسط انتقائي قد يؤدي لنتائج كاذبة (McLauchlin et al., 2004).

تمثل مقاومة عزلات الليستريا المستوحدة للصادات الحيوية مشكلة صحية هامة؛ خاصة في ظل ارتفاع نسبة مقاومة الصادات الحيوية لهذا العامل الممرض في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة (Allerberger and Wagner, 2010).

يُوضح الجدول 4 أن الليستيريا المستوحدة حساسة للأمبيسللين، الليفوفلوكساسين والفانكومايسين حيث تراوحت هالات التثبيط بين16–20 مم. بينما كان هناك تأثيراً طفيفاً للسيبروفلوكساسين على العزلات الجرثومية المستخدمة في الدراسة. وضمن شروط تجربتنا لم نجد أي تأثير مثبط للصادات الحيوية أموكسيسيللين، دوكسي سكللين وأميكاسين.

تم توثيق عزلات الليستيريا المستوحدة المقاومة للصادات الحيوية المستخدمة حالياً في علاج الليستريات مثل البنسلين والأمبيسلين والتتراسيكلين والجنتاميسين؛ بسبب اكتسابها مورثات ترمّز لإنزيمات تمتلك القدرة على تثبيط نشاط العديد من الصادات الحيوية (Silk et al., 2016; Marco et al., 2000).

أظهرت العديد من الدراسات أن عزلات الليستيريا المستوحدة حساسة لطيف واسع من الصادات الحيوية المثبطة للجراثيم موجبة الغرام وخاصةً الأمينوغليكوزيدات وغليكوببتيد ومقاومة للجيل الثاني والثالث من السيفالوسبورينات (Feld et al., 2012). أوضح الباحث البرتغالي Barbosa وزملاؤه (2013) أن 28.3% من عزلات الليليستيريا مقاومة للصادات الحيوية سيبروفلوكساسين، تتراسكلين، جنتاميسين. وهذا ما توافق مع دراستنا حيث كانت عزلات الليستيريا المستوحدة حساسة للأمبيسللين والفانكومايسين؛ بينما كانت مقاومة للأميكاسين وجنتاميسين (الأمينوغليكوزيدات). أوضح الباحث كونتر وزملاؤه أن مقاومة عزلات الليستيريا للكليندامايسين الأكثر شيوعًا، متبوعًا بلينزوليد وسيبروفلوكساسين (Conter et al., 2009). كما أن هناك دراسات عديدة أظهرت أن عزلات الليستيريا عادة ما تكون حساسة للبنسيللين–ج؛ أريثرومايسين (Aureli et al., 2003; Kovacevic et al., 2013).

يجب اتباع طريقة عيارية عند تحديد الـ MIC (مثلاً حسب CLSI) لأنها الخطوة الأولى في دراسة حساسية ومقاومة الصادات الحيوية في الزجاج (Turnidge and Paterson, 2007; Leclercq et al., 2013)؛ لأن توحيد طرائق دراسة الحساسية للصادات الحيوية في المخابر هام جداً لمراقبة انتشار مقاومة الصادات الحيوية (Madeo et al., 2015; Korsak et al., 2012).

لا يوجد دراسات كافية حول تحديد قيم الـ MIC لعزلات الليستيريا المستوحدة المنتشرة في سورية. تراوحت قيم الـ MIC بين 0.5–8 مكغ/مل (الجدول 6)؛ بينما في أخرى تراوحت بين 0.002–512 مكغ/مل (Morvan et al., 2010; Mado et al., 2015).

في الآونة الأخيرة، تم تطوير المستخلصات النباتية واستعمالها في العديد من المجالات كمضادات أكسدة طبيعية أو كعوامل مضادة للميكروبات (Hsieh et al., 2001). وتمت مناقشة آلية عمل المركبات الطبيعية الموجودة في الأعشاب والتوابل كمواد مضادة للجراثيم (Miyasaki et al., 2013).

أوضح Wafaa وزملاؤه (2019) أن تركيز 0.5% من الزيت العطري للقرفة ذو تأثير مثبط على الليستيريا المستوحدة؛ كما وجد Mith وزملاؤه (2014) أن قيمة الـ MIC لتثبيط الليستيريا المستوحدة 0.5 مكغ/مل؛ وهذا ما توافق مع نتائجنا حيث تراوح مدى MIC_{50}-MIC_{90} بين 0.5–2 مكغ/مل (الجدول 7).

بينما وجد Somrani وزملاؤه (2020) أن تركيز 0.5% من زيت القرفة يثبط تشكيل الفيلم الحيوي لليستيريا المستوحدة الناتج من ارتباط الكائنات الحية الدقيقة الحرة بالسطح. قد يكون لمركبات الكبريت في الزيت العطري للقرفة السبب في تثبيط نشاط الإنزيمات الرئيسية للجراثيم؛ أو أنها قد تتفاعل مع مجموعات السلفهيدريل SH للبروتينات مما يؤدي لموت الخلايا الجرثومية (El-Sayed et al., 2017; Vazquez-Armenta et al., 2014). وقد يكون تأثير زيت القرفة مرتبط بشكل مباشر مع وجود المكونات الفعالة مثل: الـ cinnamaldehyde cinnamyl acetate والـ cinnamyl alcohol بالإضافة لطيف واسع من المركبات الطيَّارة الأُخرى؛ (Bouhdid et al., 2010).

لُوحظ أن تأثير الزيت العطري لكينا اللاذقية طفيفاً على الليستيريا المستوحدة حيث تراوحت قيم الـ MIC بين 4–8 مكغ/مل وهالات التثبيط بين 10–11 مم وهذا ما توافق مع Sebei وزملاؤه (2015) حيث وجدوا أن قطر هالات التثبيط قد تراوحت بين11–12 مم لنوعي الكينا *E. leucoxylon* و*E. lehman* على الليستيريا ايفانوفي (*L. ivanovi*) بينما أظهرت نتائج Forstinus وزملاؤه (2019) أن قيمة الـ MIC للمستخلص الإيتانولي لكينا اللاذقية 256–512 مكغ/مل على الليستيريا المستوحدة.

لُوحظ التأثير المثبط للزيت العطري لإكليل الجبل على الليستيريا المستوحدة (الجدولان 5 و7) وهذا ما توافق مع de Oliveira وزملاؤه (2013).

تراوحت قيم الـ MIC للسرو العطري بين 4–8 مكغ/مل على الليستيريا المستوحدة بينما أظهرت نتائج Elansary وزملاؤه (2018) أنها تراوحت بين 200–570 مكغ/مل على الجرثوم.

تراوحت هالات تثبيط الليستيريا المستوحدة بواسطة زيت العطري للنارنج بين 5–7 مم (الجدول 5) بينما أظهرت نتائج Teneva وزملاؤه (2019) أنها تراوحت بين 9–12.5 مم.

قد يكون الاختلاف بين نتائج انتشار القرص والـ MIC متعلقاً بطبيعة الوسط بين آغار وسائل؛ حيث قد تكون المكونات الزيتية الكارهة للماء ضعيفة الذوبان بالماء أو تبخر المواد العطرية من وسط الآغار (Golus et al., 2016).

5- الاستنتاجات والتوصيات:

لُوحظ في دراستنا مقاومة عزلات الليستيريا المستوحدة لبعض الصادات الحيوية التي تستخدم في العلاج؛ وهذا ما يؤكد استمرارية ظهور سلالات جرثومية مقاومة للصادات الحيوية في بلدنا كما في جميع أنحاء العالم؛ مما يستدعي المراقبة المستمرة لنشوء عوامل ممرضة مقاومة للصادات؛ مما يوفر معلومات إضافية مفيدة في الدراسات الوبائية لأغراض صحية. بالنتيجة، كانت الزيوت العطرية لإكليل الجبل والقرفة، الأكثر تأثيراً ضد الليستيريا المستوحدة، الأمر الذي قد يؤهلها لأنتكون مصادر محتملة لإنتاج عوامل جديدة مضادة للجراثيم. هذا ويُوصى بإجراء دراسات أُخرى أكثر نوعيةً، في الجسم الحي، من أجل تحديد فعالية هذه الزيوت

العطرية في معالجة أخماج الليستيريا المستوحدة. في مواجهة المقاومة المتزايدة للجراثيم، يجب أن ندرك أن الإفراط في استخدام الصادات الحيوية هو السبب الرئيسي لهذه المقاومة؛ لذلك، يجب زيادة الوعي والثقافة الطبية لمبادئ العلاج الأمثل للصادات الحيوية من خلال وصفة طبية لتحقيق نتائج أفضل للمرضى والحد من ظهور المقاومة المتعددة؛ لذا يجب استخدام العلاج باستخدام الصادات الحيوية فقط للمرضى المصابين بالأمراض الجرثومية؛ والاعتماد على التشخيص النوعي للمرض قبل استخدام الصادات الحيوية التي يجب أن تقضي على الحد الأقصى من الحمولة الجرثومية (Ball et al.,2002; Bruinsmaetal., 2004). وحسب نتائج الدراسة الحالية يُنصح باستخدام الأمبيسللين، والليفوفلوكساسين لمرضى داء الليستيريات؛ ومتابعة دراسة الأثر المثبط والسمية الخلوية للزيت العطري للقرفة وإكليل الجبل على الليستيريا في الجسم الحي (حيوانات التجربة مثل فئران BALB/c).

المراجع References:

1. أبو يونس عهد؛ سليق سمير؛ أبو غرة صياح. التحري عن وجود بكتيريا الليستيريا في الحليب الخام السوري وبعض منتجاته. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 2005 المجلد 21 العدد 1 الصفحات 477 – 487.
2. المريري أيمن؛ أبو يونس عهد؛ التحري عن وجود بكتيريا الليستيريا *Listeria* في الحليب الخام في سورية. (هـ ط ذ س– ب ج/ت د ع 839 تشرين الثاني، 2009).
3. المريري أيمن؛ أبو يونس عهد؛ حمود رزان. دراسة التضاد بين بكتيريا حمض اللبن المعزولة من الجبن الأبيض البلدي وبعض أنواع البكتيريا الممرضة. (هـ ط ذ س–ب ج/ ت ت إ 239، آذار 2013).
4. المريري أيمن؛ رمضان ليلى. تمييز الأنماط المصلية الرئيسية لـ *Listeria monocytogenes* (هـ ط ذ س– ب ج/ت د ع 1076؛ تشرين الأول 2014).
5. المريري أيمن؛ أبويونس عهد؛ حمود رزان، حاج محمود نيرمين. تطبيق البكتريوسين (Enterocin A) المنتج من العزلة المحلية AA3 *Enterococcus feacium* كمادة حافظة للجبنة (هـ ط ذ س– بج/ تدع١١٤٢؛آب 2016).
6. Aarnisalo, K., Rasca L., Wirtanen G. 2007 "Survival and growth of *Listeria monocytogenes*in lubricants used in the food industry" Food Control 18 (2007) 1019–1025.
7. Akhtar M. S., B. Degaga, and T. Azam, "Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review," Biological Sciences and Pharmaceutical Research, **2014**, 2(1):1–7.
8. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect. 2010;(16):16–23.
9. Al-Mariri, A.; Younes, A.; Ramadan, L. Prevalence of *Listeria* spp. in raw milk in Syria. Bulg. J. Vet. Med. 2013, 16, 112–122.
10. Aureli P, Ferrini AM, Mannoni V, Hodzic S, Wedell- Weergaard C, Oliva B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. Int J Food Microbiol. 2003;83(3):325–30.
11. Ayman AL-MARIRI, Ghayath Swied, Adnan Oda and Laila Hallab. Antibacterial activity of *Thymus Syriacus* Boiss essential oil and its components against some Syrian gram negative bacteria isolates. IJMS, **2013**, 38:7.
12. Ayman AL-MARIRI, Mazen SAFI. Effect of medium pH on antibiotic activity against Syrian *Brucella* spp. isolates. Iran J Med Sci, **2013**, 38(3):248-254.
13. Arumugam G., M. K. Swamy, and U. R. Sinniah, "Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance," Molecules, **2016**, 21:(4), 369.
14. Ball P, Baquero F, Cars O et al. Antibiotic therapy of community respiratory tract infection: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. J Antimicrob Chemother **2002**; 49: 31–40.
15. Barbosa J, Magalha˜es R, Santos I, Ferreira V, Branda˜o TR, Silva J, et al. Evaluation of antibiotic resistance patterns of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates in Portugal. Foodborne Pathog Dis. 2013;10(10):1–6.
16. Bell, C., Kyriakides, A. 2000"Listeria una aproximacion Practica al microorganismo y Su control en Los alimentos "Ed. Acricbia, S.A. Zaagoza. Espance 117 – 121.
17. Bouhdid, S.; Abrini, J.; Amensour, M.; Zhiri, A.; Espuny, M.; Manresa, A. Functional and ultrastructural changes in Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus induced by Cinnamon verum essential oil. J. Appl. Microbiol. **2010**, 109, 1139–1149.
18. Brooker, M. Ian; Slee, Andrew. "Eucalyptus camaldulensis". Royal Botanic Gardens Victoria. Retrieved 4 April 2019.
19. Bruhn K. W, Craft N., Miller J. F.2007 "Forum Listeria as a vaccine vector" Microbes and Infection 1- 11.

20. Bruinsma N, Kristinsson KG, Bronzaaer S et al. Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother, **2004**; 54: 1045–1050.
21. Cappucino J.G., N.Sherman; Microbiology:ALaboratory Manual, Addisonñ Wesley **2002**.
22. CFSAN (Center for Safety and Applied Nutrition) 2002 "Food borne pathogen microorganisms – *Listeria monocytogenes*"www. ym. cfsam. fda. gov. chap6. html
23. Chau, M.Y., Shelef, L.A. 1989 "Nutritioal requirements of *Listeria* spp "J. Microbiology new Orleans .133 –135 .
24. "Citrus ×aurantium". Germplasm Resources Information Network(GRIN). Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA). Retrieved 2010-01-05.
25. Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2009;(128):497–500.
26. Dameshvar, M.I., Brooks, J.B., Malcolm, G.B. 1989 "Analysis of fermentation products of Listeria species by frequency – pulsed electroncapture gas – liquid chromatography "Can. J. Microbiol. 35 :786 –793.
27. de Oliveira Maíra Maciel Mattos, Danilo Florisvaldo Brugnera, Roberta Hilsdorf Piccoli. Essential oils of thyme and Rosemary in the control of Listeria monocytogenes in raw beef. Brazilian Journal of Microbiology 44, 4, 1181-1188 (2013).
28. Elansary Hosam O., Samir A. M. Abdelgaleil , Eman A. Mahmoud, Kowiyou Yessoufou, Khalid Elhindi and Salah El-Hendawy. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. BMC Complementary and Alternative Medicine (2018) 18:214
29. El-Sayed, H.S.; Chizzola, R.; Ramadan, A.A.; Edris, A.E. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. Food Chem. **2017**, 221, 196–204.
30. FDA (Food and Drug Administration Organization) 2002 "Chapter10: *Listeria monocutogenes*" www.cfsam. fda. gov/ebam/bam-10.html.
31. Feld L, Knudsen GM, Gram L. Bactericidal antibiotics do not appear to cause oxidative stress in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(12):4353–7.
32. Forstinus Ozioma Nwabor, Kitiya Vongkamjan, and Supayang Piyawan Voravuthikunchai. Production, and Cell Membrane of the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. Foodborne Pathogens and Disease, 2019; 16(8):
33. Gerner-Smidt P, Ethelberg S, Schiellerup P, Christensen JJ, Engberg J, Fussing V, et al. Invasive listeriosis in Denmark 1994–2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. Clin Microbiol Infect. 2005;(11):618–24.
34. Golus, J.; Sawicki, R.;Widelski, J.; Ginalska, G. The agar microdilution method—A new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. J. Appl. Microbiol. **2016**, 121, 1291–1299.
35. Holt J.G., N.R.Krieg; Bergeyís Manual of Determi- native Bacteriology, Ninth Edition LippincottWilliams & Wilkin Publishers **2000**.
36. Hsieh PC, Mau JL, Huang SH. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Food Microbiol 2001; 18:35-43.
37. Inouye S, Takizawa T, & Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J Antimicrob Chemother, **2001**, 47: 565–573.
38. Kannan N; Laboratory Manual in General Micro- biology, Panima Publishers **2002**.
39. Korsak D, Borek A, Daniluk S, Grabowska A, Pappelbaum K. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. Int J Food Microbiol. 2012 Sep;158(3):203-8.
40. Kovacevic J, Sagert J, Wozniak A, Gilmour MW, Allen KJ. Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in Listeria spp. recovered from food and food production environments. Food Microbiol. 2013;(34):319–27.
41. Leekha S; Terrell CL; Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. Mayo Clin. Proc. **2011**, 86:156–167.
42. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2013;19(2):141–60.

43. Li, Z. H., Cai, M., Liu, Y. S., Sun, P. L., & Luo, S. L. (2019). Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis. Molecules (Basel, Switzerland), 24(8), 1577. https://doi.org/10.3390/molecules24081577.
44. Madeo M., Rosario M., Careddu A.M.L., Amato E., Pontello M.M., Cocuzza C. E. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in northern Italy, 2008–2010: MIC determination according to EUCAST broth microdilution method. Journal of chemotherapy; 2015, 27(4): 201-206.
45. Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. Pathogens (Basel, Switzerland), 8(1), 15. https://doi.org/10.3390/pathogens8010015.
46. Marco, F., M. Almela, J. Nolla-Salas, P. Coll, I. Gasser, M. D. Ferrer, M. de Simon, and the Collaborative Study Group of Listeriosis of Barcelona**.** 2000.In vitro activity of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes*strains isolated in Barcelona, Spain. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **38:**259–261.
47. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. Int J Food Microbiol. 2004;(92):15–33.
48. Mith, H.; Duré, R.; Delcenserie, V.; Zhiri, A.; Daube, G.; Clinquer, A. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. Food Sci. Nutr. **2014**, 2, 403–416.
49. Miyasaki y, Rabenstein JD, Rhea J, et al. Isolation and Characterization of Antimicrobial Compounds in Plant Extracts against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Plos One 2013; 8(4):1594-1601.
50. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve´-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(6):2728–31.
51. National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI). 2006.Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard. Document M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
52. Sebei Khaled, Fawzi Sakouhi, Wahid Herchi, Mohamed Larbi Khouja and Sadok Boukhchina. Chemical composition and antibacterial activities of seven Eucalyptus species essential oils leaves. Sebei et al. Biological Research 2015, 48:7.
53. Seeliger, H.P.R. 1987, "*Listeria* In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 1235 – 1245.
54. Silk BJ, Date KA, Jackson KA, Pouillot R, Holt KG, Graves LM, et al. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. Clin Infect Dis. 2012;54(S5):S396–404.
55. Shaaban HAE, El-Ghorab AH, & Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. J Essen Oil Res, **2012**, 24:203–212.
56. Somrani Mariem, María-Carmen Inglés, Hajer Debbabi, Ferid Abidi and Alfredo Palop. Garlic, Onion, and Cinnamon Essential Oil Anti-Biofilms' Effect against *Listeria monocytogenes*. Foods **2020**, 567(9): 1-12.
57. SR EN ISO 11290-2/A1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method, Amendament 1: Modification of the enumeration medium. 2005.
58. Swamy MK, Akhtar MS and Sinniah UR Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, **2016**, 2016:1-21.
59. Teneva Desislava, Rositsa Denkova-Kostova, Bogdan Goranov, Yana Hristova-Ivanova, Aleksandar Slavchev, Zapryana Denkova and Georgi Kostov. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil
60. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. ClinMicrobiol Rev. 2007;20(3):391–408.

61. Vazquez-Armenta, F.J.; Ayala-Zaval, J.F.; Olivas, G.I.; Molina-Corral, F.J.; Espinoza, B.A. Antibrowning and antimicrobial effects of onion essential oil to preserve the quality of cut potatoes. Acta Aliment. **2014**, 43,640–649.
62. Wafaa I. Brnawi Navam S. Hettiarachchy Ronny Horax Geetha Kumar- Phillips Steven Ricke. J food processing and preservation 2019; 43(3): e13888.
63. Wiedmann, M. 2003 "ADSA Foundation Scholar Award— An Integrated Science-Based Approach to Dairy Food Safety: *Listeria monocytogenes* as a Model System" J. Dairy Sci. 86:1865-1875.
64. Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? Molecules (Basel, Switzerland), 24(11), 2130.
65. Zeinab Al-Helwany, Adnan Ali-Nizam, Ahd Abo Yones (2021). Evaluation of the Bioactivities of Plant Extractions from Lavandula stoechas L. and Phlomis syriaca Boiss on Some Pathogenic Microorganisms Isolated from Local Fresh Red Meat. ACSAD.Damascus, Syria, No 4.