التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات الشاي والتانينات المفصولة منه في نمو جرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *Escherchia coli* (EPEC) المعزولة من الأطفال الرضع المصابين بالإسهال في مدينة الموصل

ذكرى صديق الطائي و خضر داؤد سليمان

قسم الصيدلة السريرية/كلية الصيدلة قسم علوم الحياة/كلية التربية

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2006/6/9

تاريخ القبول 2006/10/3

ABSTRACT

This study included isolation and diagnosis of the Enteropathogenic Escherchia coli (EPEC)from diarrhoeal cases in infants.Specimens were collected from(243) patients under 2 years during the period July 2002-March 2003. The follwing serotypes were isolated : (EPEC)O_{126} (47%), (EPEC) O_{119} (%26) (EPEC) O_{111} (%20), and (EPEC) O_{114}(7%) . The results indicated that the aqueous, alcoholic extracts and the Tannins separated from tea have inhibitory effect in all serotypes of EPEC. The study also included determination of the minimum inhibitory concentration (M.I.C) for the aqueous, alcoholic and organic extracts and some of the effective components of the tea . The detection of the inhibitory effect for the separated Tannin in the growth of the EPEC In vivo, using the Illeal rabbit loop test showed that the Tanin has an inhibitory effect in the EPEC through the measurement of the dilatation indicator which was showed to be : (0.38) and in comparison with the other dilatation indicator measurement.

الملخص

تضمنت الدراسة عزل جرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *Escherchia coli* (EPEC) من الأطفال الرضع المصابين بالإسهال وتشخيصها، جمعت (243) عينة من حالات الإسهال لأطفال دون السنة الثانية من العمر للمدة من شهر تموز 2002 ولغاية شهر شباط 2003 .

تمكنت الدراسة من عزل الأنماط المصلية الآتية : النمط المصلي O_{126}(EPEC) الذي يعد من أكثر الأنماط المصلية شيوعاً وبنسبة(47%) يليه الـنمط المـصلي O_{119} وبنـسبة(26%)، في حين عزل النمط المصلي O_{111} بنسبة(20%) ، أما النمط المـصلي O_{114} فقـد عزل بنسبة (7%) 0

أظهرت النتائج أن للمستخلص المائي والكحولي والتانينات المفصولة من الـشاي تـأثيراً تثبيطياً في الأنماط المصلية جميعا المعزولة لجرثومة (EPEC)،كما حدد في هـذه الدراسـة التركيز المثبط الأدنىInhibitory concentration Minimum للمستخلـصات المائيـة والكحولية والعضوية والتانينات المفصولة من الشاي 0بالاضافة إلى التحـري عـن التـأثير التثبيطي للتانينات في نمو جرثومة EPEC داخل الجسم الحي *In vivo* وباسـتخدام اختبـار أمعاء الأرنب المربوطة وتبين أن للتانينات تأثيرا تثبيطيا في نمـو وجرثومـة الـ EPEC وتكاثرها من خلال حساب مؤشر التمدد الذي كان بمقدار (0.38) مقارنة بمؤشرات التمـدد الأخرى.

المقدمة

يعد نبات الشاي احد أفراد الفصيلة الكاميلية Theaceae ،الذي يمتاز بكونـه مـستديم الخضرة ، وأوراقه رمحية الشكل جلدية القوام ، مسننة أو مموجة الحواف ، تحتـوي علـى العديد من الغدد الزيتية . ذات أزهار وردية أو بيض مصفرة ومفردة تخرج عادة مـن إبـط الأوراق(1). وتُعد الصين الموطن الأصيل لها ومنها انتشرت إلى اليابان والهند وسيلان (2). أستعمل الشاي في الطب الشعبي منذ مئات السنين لتأثيراته العلاجية المتنوعة ، إذ أنه ينـشط القلب ويساعد على الهضم كما يستعمل في حماية الأسنان من التسوس (3) . للشاي الأسـود تأثيراً قوياً ضد الذيفانات المختلفة والمسببة لتحلل الـدم وخاصـة α - toxin الـذي تفـرزه جرثومة *Staphylococcus aureus* وكـذلك الـذيفان الـذي تفـرزه جرثومـة *Vibrio parahaemolyticus* مما يشجع على استخدامه علاجاً لحالات التسمم الغذائي (4).

تحتوي أوراق الشاي على قلويد الكافئين Caffeine alkaloid (ثلاثي مثيل الزانثين) وبنسـبة (1-5) % ، ومادة التانـين القابضـة Tannin بنسبة (10 – 24) % (5) ، وتحتوي على قلويدين آخرين يعرفـان بالثيوبرومـين Theobromine (ثنائـي مثيـل الزانثين) والثيوفيلـين Theophyllin

(وهو نظير الثيوبرومـين) وتتراوح نسبتهما من (1 – 15) % . كما تحتوي على زيوت طيارة Volatile oils بنسبة (75) % وهـو الـذي يعطـي للـشاي الطعـم والرائحـة المميزتين (6) .

ونظراً لأهمية هذا النبات واستخدامه الواسع في عدد من الدول ,تم دراسة التأثير التثبيطي لهذا النبات والتانينات التي فصلت منه في نمو عدد من الأنماط المصلية لجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء 0

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية :

جمعت (243) عينة براز من الأطفال المصابين بالإسهال أعمارهم دون السنة الثانية ومن كلا الجنسين في مستشفى ابن الأثير في الموصل للمدة من أوائل شهر تموز 2002 ولغاية أواخر شهر شباط 2003 ،إذ نقل ما يقرب من (1) غم من البراز من كل عينة إلى قنانٍ حاوية لوسط المرق المغذي Nutrient Broth ،وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة بعدها لقحت على الأوساط الانتخابية الصلبة ومنها وسط ماكونكي حيث تم إجراء الاختبارات الشكلية والكيموحيوية على يع العزلات جميعاً وحسب ما ورد في (7) ، ولغرض التشخيص التأكيدي للايشريكية القولونية ، لقحت المستعمرات المنقاة على وسط ايوسين المثيلين الأزرق Eiosin Methylene Blue (EMB) بطريقة التخطيط ، وحضنت الأطباق عند درجة حرارة (37) م مدة (24-18) ساعة ثم لوحظ شكل مستعمرات الايشريكية القولونية التي تكون صغيرة الحجم وملساء ذات بريق معدني اخضر أُرسلت بعد ذلك العزلات الجرثومية كافة للايشريكية القولونية المعزولة إلى بغداد لغرض تنميطها مصليا في قسم مختبرات الصحة العامة / وزارة الصحة وذلك باستخدام طريقة التلازن مع الأمصال المضادة على الشريحة الزجاجية .

تحضير المستخلصات النباتية

المستخلصات المائية : حُضّرت المستخلصات المائية بالاعتماد على طريقة Riose وجماعته (8) وذلك بمزج (40) غم من النموذج النباتي مع (160) سم^3 من الماء المقطر وسحقه باستخدام جهاز السحق الكهربائي(Blendor) وعُقّم هذا المستخلص بعد تحضيره باستخدام المرشحات الغشائية (membrane filter 0.22 µ) 0

المستخلصات الكحولية:-

اتبعت طريقة الباحث Grand وجماعته (9) وذلك بسحق(20) غم من النبات في (200) سم^3 من الكحول الاثيلي وبتركيز (95%) داخل حمام ثلجي وبعد الحصول على المستخلص عقم بطريقة البسترة بدرجة (62) م لمدة 10 دقائق 0

تحضير المستخلصات العضوية باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet

حضرت المستخلصات العضوية بإتباع طريقة الرمضاني (10) لنبات الشاي ، فقد أُختبر مذيبان متفاوتان بالقطبية ، وهما الايثر البترولي (Petrelium ether) و البنزين

(Benzene) وباستخدام جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet ، إذ وضع النموذج النباتـي المسـحوق بوزن (50) غم داخـل الثمبـل Thumble لجهاز الاستخلاص المستمر الحاوي لـ (250) سم^3 من الايثر البترولي ، سخن الجهاز بوساطة حمام مائي بدرجـة حرارة (40-60) مـدة (3-4) أيام إلى أن أصبح المذيب عديم اللون . ثم رُكز الناتج العضوي باسـتخدام جهاز المبخر الدوار لحين تكوّن طبقة سميكة من المادة التي حفظت في قنـانٍ زجاجيـة ذات غطاء محكم إلى استخدامها ، جفف النموذج النباتي المتبقي للتخلص من بقايا المذيب ووضـع النموذج النباتي مرة أخرى في جهاز الاستخلاص لتعاد الطريقة نفسها ولكن باستعمال البنزين وبدرجة حرارة (75) م للحصول على المستخلص البنزيني 0

استخلاص المكونات الفعالة

استخلاص التانينات من نبات الشاي

أُستخلصت التانينـات من نبات الشاي باستخدام جهاز الاسـتخلاص المستمر بحسـب طريقـة Panshin و Harrar (11) وباستخدام الماء المقطر بوصـفه مـذيباً وبمعـدل (8) ساعات0 وقد أُجريت عدة اختبارات كيميائية للتأكد من نقاوة التانين ومنها قابليتها للذوبان فـي الماء والايثانول والأسيتون والايثر والكلوروفورم وثنائي كبريتيد الكاربون والبنـزين,وكـذلك مدى تفاعلها مع محلول كلوريد الحديديك والأملاح المعدنية كخلات الرصاص ومحلول ثنـائي كرومات البوتاسيوم(12).

وكُشِف عن التانين المفصول من نبات الـشاي باسـتخدام تقنيـة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) التي اسـتعملت فيها صفائح رقيـقة مغطاة بمـادة هلام السيلكـا (Silica Gel)المجهزة من شركة Merck ولقد اعتمدت هذه التقنية على قياس سرعة جريان التانين على الطبقة الرقيقة إذ قيست المـسافة التـي قطعتهـا العينة من نقطة البداية إلى النقطة التي توقفت عندها ، وتم حساب سـرعة الجريـان (RF) اعتمادا على المعادلة الآتية (13)

$$\text{معدل سرعة الجريان للعينة (RF)} = \frac{\text{المسافة التي تقطعها العينة من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب من نقطة البداية}}$$

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والمكونات الفعالة

أُعتمدت طريقة (14) إذ حُضرت أقراص من ورق الترشـيح (Whatmann No.1) المشبعة بتراكيزمختلفة من المستخلصات (200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5، 6,25) ملغـم / سم^3 وذلك بإضافة(0.1) سم^3 من كل تركيزمن المستخلص إلى قنينة تحتوي على (10) أقراص معقمة (15) .ثم ثبتت الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة بوسـاطة ملقط معقم وحـضـنت

بدرجة حرارة (37) م مدة (14-16) ساعة ، ولبيان الحساسية للمستخلصات المستخدمة حُسِب حزام التثبيط بالمقارنة بالمضادات الحيوية من نوع , (30 µg) Cephalexin Trimethoprim (5 µ g) ,Gentamycin (10 µg), Nalidixic acid (30 µg) , ، بوصفها عينة سيطرة موجبة للجراثيم حسب ما جاء في توصيات منظمة الصحة العالمية . (16)

طريقة اختبار العكارة

استخدمت هذه الطريقة لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية المدروسة فضلاً عن طريقة الانتشار بالاقراص0 إذ أُضيف (0.1) سم^3 من المستخلص النباتي بتراكيز مختلفة إلى أنابيب حاوية لـ (9.8) سم^3 من وسط المرق المغذي المعقم ولقحت هذه الأنابيب بـ (0.1) سم^3 من العالق الجرثومي وبتركيز (10^8 خلية / سم^3) بمقارنتها مع أنابيب ماكفارلاند القياسية وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز ، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37) م مدة (14-16) ساعة ، قيست العكارة بعد ذلك باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع (SERIES CECIL CE1021,1000) وعند طول موجي (595) نانوميتر ، إذ حُدّد مدى تأثير المستخلصات النباتية في نمو الجراثيم بالمقارنة بعينة السيطرة (17) .

تحديد التركيز المثبط الأدنى

Determination of Minimum inhibitory Concentration

حُدّد التركيز الأدنى المثبط للمستخلصات المائية والكحولية والتانينات المفصولة من نبات الشاي باستخدام اختبار العكارة إذ حضرت التخافيف (200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25) ملغم / سم^3 من كل مستخلص نباتي إذ حدّد التركيز الأدنى المثبط الذي هو أعلى تخفيف للمستخلص النباتي يمنع نمو الجراثيم وذلك بالمقارنة بعينة السيطرة التي تتكون من (9.8) سم^3 من وسط المرق المغذي الملقح بـ (0.1) سم^3 من المعلق الجرثومي و (0.1) سم^3 من كل تركيز من التراكيز المختلفة للمستخلص النباتي0

دراسة تأثير المكونات الفعالة في جرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء داخل الجسم الحي (*In vivo*) باستخدام اختبارأمعاء الأرانب المربوطة (Rabbit ligated ileal loops)

تحضير المعلق الجرثومي

لُقّح (10) سم^3 من مرق نقيع القلب والدماغ المعقم بالموصدة بـ (0.5) سم^3 من جرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء في الطور أللوغاريتمي وحضنت بدرجة حرارة (37) م$^\circ$ مدة (14-16) ساعة .

أُختبرتاثيرالتانينات المفصولة من نبات الشاي في جرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء داخل الجسم الحي وذلك بالاعتماد على اختبار أمعاء الأرانب المربوطة (18), أجري الفحص على أرانب بصحة جيدة وبأوزان تراوحت بين(1.5 -2) كغم ، إذ خُدر الحيوان من خلال حقنه في (العضلة بمادتي الكيتامين (Ketamin) بنسبة (20) ملغم / كغم من وزن الجسم والزايلازين (Xylazin) بنسبة (0.8) ملغم / كغم ، ثم أُستُحدِث شق بطول (10) سم تحت عظم القص مباشرة وأُستخرجت الأمعاء الدقيقة ومنها اللفائفي وغُسلت بمحلول رنكر وذلك بحقنه بعد ألاثني عشري مباشرة بمسافة قصيرة ، رُبطت الأمعاء بعد ذلك بشكل قطع بطول (5) سم بلغت ثلاث قطع هي :

1-القطعة الأولى : حقن (0.5) سم^3 من المعلق الجرثومي الذي حضر في الفقرة السابقة و (0.5) سم^3 من المحلول الملحي الفسلجي المعقم .

2-القطعة الثانية : حقنت هذه القطعة بـ (1) سم^3 من مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth (B.H.I) المعقم للسيطرة .

3-القطعة الثالثة : حُقنت بـ (0.5) سم^3 من المعلق الجرثومي و (0.5) سم^{3}من التانينات المفصولة من الشاي .

أُدخلت الأمعاء بعد ذلك في التجويف البطني . خيط الجرح وبعد (8 - 10) ساعة استخدمت جرعة مميتة من الكلوروفورم لقتل الحيوان . وفُتِح الجرح وأُحتسبت دلائل أو مؤشرات التمدد (Dilatation Indices) بحساب النسبة بين حجم السوائل المتجمعة في كل قطعة من الأمعاء بالسم^3/ طول كل قطعة بالسم . فإذا كان مقدار التمدد (0.4)أو أكثر فتعد النتيجة موجبة .

النتائج والمناقشة

كانت نتائج الاختبارات الشكلية والكيموحيوية والتي أجريت على العزلات الجرثومية مطابقة لما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة(19)0

وفيما يتعلق بنتائج هذه الدراسة فإن الجدول (1) يوضح بأن نسبة إصابة الأطفال دون السنة الثانية في مدينة الموصل بجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء (EPEC) هي (7.61%) إذ عُزلت (15) سلالة من مجموع (197) عزلة ، ويعد النمط المصلي O_{126} أكثر الأنماط المصلية شيوعاً إذ تكرر (7) مرات أي بنسبة(46.64%) ، في حين تكرر النمط المصلي O_{119} أربع مرات وبنسبة (26.67%) ، في حين عزل النمط المصلي O_{111} (3) مرات وبنسبة (20.01%) ، أما النمط المصلي O114 فقد عزل مرة واحدة وبنسبة (6.67 %) وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل إليه الباحث الرحالي (20) .

الجدول (1) توزيع الأنماط المصلية والنسب المئوية لجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء EPEC بين الفئات العمرية المختلفة ضمن مدينة الموصل .

الفئات العمرية بالأشهر	العدد الكلي للعزلات المختلفة	النسبة المئوية	عدد العزلات المنمطة مصليا	النسبة المئوية	عدد الأنماط المصلية			
					O126	O119	O111	O114
6 <	61	30.97	8	13.12	5	1	2	
12 – 7	69	35.03	4	5.80	1	3		
18 – 13	38	19.29	2	5.26	1			1
24 – 19	29	14.72	1	3.45			1	
المجموع	197		15	7.61	7	4	3	1
النسبة المئوية					46.67	26.67	20.01	6.67

كما أشار الجدول السابق إلى توزيع الأنماط المصلية لجرثومة EPEC بحسب المجموعات العمرية المختلفة إذ أظهرت النتائج نسبة عالية من حالات الإصابة بجرثومة EPEC بين الأطفال الذين كانت أعمارهم أقل من6 أشهر إذ بلغت (13.12%) تلتها الفئة العمرية بين (12-7) شهر وبنسبة (5.8 %) ثم الفئة العمرية (18-13) شهر وبنسبة (5.26%) وبعدها الفئة العمرية (24-19) شهر وبنسبة (3.45%) ، ومن هنا نستنتج أن هناك تناقصاً في نسبة الإصابة بجرثومة EPEC مع تقدم العمر وقد يعود السبب في ذلك إلى تكامل نمو الجهاز المناعي لدى الأطفال مع تقدم العمر0

أما فيما يتعلق باختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات فقد أظهرت الدراسة إمتلاك المستخلص المائي لنبات الشاي فعالية تثبيطية معتدلة على جميع الأنماط المصلية لجرثومة EPEC مقارنة بالمضادين الحيويين cephalexin وNalidixic acid وتأثيراً ضعيفاً مقارنة بالمضادين Gentamycin و Trimethoprim وكما هو موضح في الجدول (2) وهذا يتفق مع ما أشار إليه Zvcetkov وجماعته (21) الذين أكدوا على إمتلاك المستخلص المائي لنبات الشاي فعالية تثبيطية ضد الجراثيم وكذلك فعالية مضادة للأورام .

وكان للمستخلص الكحولي فعالية تثبيطية عالية في الأنماط المصلية O_{126} و O_{119} مقارنة بعينات السيطرة القياسية cephalexin و Nalidixic acid و Gertamycin ، وفعالية تثبيطية جيدة مقارنة بالمضاد الحيوي Trimethoprim ، أما النمطان المصليان O_{111} و O_{114} فقد أظهرا حساسية عالية مقارنة بالمضادات الحيوية cephalexin و Nalidixic acid و Gentamycin ، وحساسية معتدلة مقارنة بالمضاد الحيوي Trimethoprim ، وقد يعزى ذلك إلى إحتواء الشاي على متعدد الفينول الذي أظهر فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام (22)، وقد يعود ذلك إلى إحتواء الشاي على مادة epigallocatechin gallate (EGCG) الفعالة في تثبيط نمو جرثومة *E. coli* وجرثومة *staph. aureus* بدرجة أكبر ويكون تأثيرها القاتل من خلال تراكمها على غشاء الخلية (23) .

كما أظهرت التانينات المفصولة من نبات الشاي تأثيراً تثبيطياً عالياً على النمطين O_{126} و O_{119} بالمقارنة بعينات السيطرة جميعاً القياسية المستخدمة في حين أظهرت تأثيراً تثبيطياً عالياً في النمطين O_{111} و O_{114} مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية cephalexin و Nalidixic acid و Gentamycin وتأثيراً تثبيطياً معتدلاً بالمقارنة بالمضاد الحيوي Trimethoprim وهذا يتفق مع ما أشارت إليه دراسات (24) التي أوضحت أن الفعالية التثبيطية لنبات الشاي تنتج عن محتواها العالي من التانين التي تعد من أكثر المواد القاتلة للجراثيم والفايروسات ، والتي تستعمل في علاج الإسهال (25) وهذه الفعالية التثبيطية العالية للتانين قد تتسبب عن تكوين أواصر هيدرجينية مع البيتيدات مما يوقف بناء البروتين (26) . ولم يظهر مستخلص الأيثر البترولي والبنزيني فعالية تثبيطية في الأنماط المصلية ، لعدم ذوبان المركبات الفعالة والمؤثرة في جرثومة EPEC في الايثر البترولي والبنزين.

الجدول (2) الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الشاي والتانينات المفصولة منه في نمو الأنماط المصلية المختلفة لجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (قطر دائرة التثبيط مقاساً بالملم) .

نوع المعاملة		الأنماط الجرثومية للايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء			
		O126	O119	O111	O114
المستخلص المائي للشاي		1.16±9	0.58±9	0.58±11	0.58±10
المستخلص الكحولي للشاي		0.58±21	1.0±20	0.58±21	0.58±20
المستخلص الايثر البترولي للشاي		--	--	--	--
المستخلص البنزيني للشاي		--	--	--	--
التانينات		0.0±22	1.0±21	0.58±21	1.0±20
Cephalexin	المضادات القياسية	0.0±13	0.0±12	1.0±12	0.0±11
Nalidixic acid		1.0±15	0.58±14	1.0±16	1.0±14
Gentamycin		1.0±17	0.0±16	1.16±20	1.16±18
Trimethoprim		0.0±21	0.0±20	0.58±22	0.0±21

- (--) تشير إلى عدم وجود فعالية 0
- الأرقام بعد الإشارة ± تمثل الخطأ التجريبي0
- قطر القرص 6 ملم 0
- قطر دائرة التثبيط للمستخلص اكبر من قطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة (تثبيط عالٍ) .
- قطر دائرة التثبيط مساوٍ لقطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة (تثبيط جيد) 0
- قطر دائرة التثبيط اقل من قطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة (6-12) ملم حساسية معتدلة (MS)0
- قطر دائرة التثبيط للمستخلص اقل من قطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة بأكثر من(12) ملم مقاومة (R) حسب ما ورد في المصدر (16)0
- معدل قطر دائرة التثبيط حسب باستخدام ثلاث عزلات لكل نمط مصلي للجرثومة .

تأثير التراكيز المختلفة للمستخلصات النباتية ومكوناتها الفعالة في الأنماط المصلية المعزولة لجرثومة EPEC

يوضح الجدول (3) تأثير مستخلصات نبات الشاي والتانينات المفصولة منه بتراكيز مختلفة في الأنماط المصلية قيد الدراسة إذ أظهرت النتائج أن للمستخلص المائي لنبات الشاي فعالية تثبيطية واطئة نوعاً ما في الأنماط المصلية لجرثومة EPEC عند التركيز (200) ملغم / سم^3 0

الجدول (3) التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية لنبات الشاي وللتانينات المفصولة منه بتراكيز مختلفة في الأنماط المصلية المختلفة لجرثومة EPEC (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم) .

الأنماط المصلية لجرثومة EPEC	نوع المعاملة	تركيز المستخلص (ملغم / سم3)					
		200	100	50	25	12.5	6.25
O_{126}	المستخلص المائي	a1.16±9	b0.0±0	0	0	0	0
	مستخلص الكحولي	a 1.0±21	b0.58±18	c 1.0±14	d0.0±9	e0.0±0	0
	التانينات	a0.0±22	b0.58±20	c1.16±16	d0.58±12	e 1.0±9	f0.0±0
O_{119}	المستخلص المائي	a0.58±9	b0.0±0	0	0	0	0
	المستخلص الكحولي	a 1.0±20	b1.16±17	c0.58±13	d0.58±9	e0.0±0	0
	التانينات	a 1.0±21	b0.58±18	c 58±15	d 1.16±9	e0.0±0	0
O_{111}	المستخلص المائي	a0.58±11	b 1.16±9	c0.0±0	0	0	0
	المستخلص الكحولي	a0.58±21	b0.58±17	c 0.0±15	d 0.0±12	e0.0±9	f0.0±0
	التانينات	a0.58±21	b0.58±16	c1.0±13	d0.58±10	e0.0±0	0
O_{114}	المستخلص المائي	a0.58±10	b 0.0±0	0	0	0	0
	المستخلص الكحولي	a0.58±20	b 1.0±17	c 1.0±13	d0.58±10	e0.0±0	0
	التانينات	a 1.0±20	b0.58±17	c 0.58±15	d 1.0±9	e0.0±0	0

- معدل دائرة التثبيط حسب باستخدام ثلاث عزلات لكل نمط مصلي .
- الحروف المختلفة افقياً تعني وجود فرق معنوي عند مستوى معنوية ($P<0.05$)

أما المستخلص الكحولي فقد أظهر تأثيراً تثبيطياً أعلى من المستخلص المائي في الأنماط المصلية جميعاً وقد تناسب تأثيره ، طردياً مع التركيز مع وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$) بين معدلات أقطار التثبيط وتأثير كل تركيز في كل نمط من الأنماط المصلية للجرثومة وإن اقل تركيز مثبط كان على الأغلب مساويا لـ (50) ملغم / سم^3 لجميع السلالات عدا السلالة O_{111} إذ كانت حساسة للتركيز(25) ملغم أيضا (27) كما موضح في الجدول (3) والصورة (1) .

الصورة(1) تأثير المستخلص الكحولي للشاي بتراكيز مختلفة في النمط المصلي O_{126} لجرثومة
EPEC مقارنة بالمضاد الحيوي Trimethoprim

أما التانينات المفصولة من نبات الشاي فقد أظهرت تأثيراً تثبيطياً عالياً في الأنماط المصلية EPEC إذ بلغ أعلى فعل تثبيطي لها (22) ملم في النمط المصلي O_{126} مع وجود فروق معنوية بين معدلات أقطار التثبيط وتأثير كل تركيز وكما موضح في الجدول (3) والصورة (2) وكانت التانينات مؤثرة في تراكيزها جميعاً ما عدا التركيز (6.25) في النمط المصلي O_{126} ، في حين كانت التانينات مؤثرة في التراكيز جميعاً ماعدا التركيزين (12.5) و(6,25) في الأنماط المصلية O_{119} و O_{111} و O_{114} وهذه النتائج جاءت مطابقة لما توصل إليه Tylor وجماعته (28) الذين أشاروا إلى أن المادة الفعالة في الشاي هي التانينات التي لها القدرة على الذوبان في الماء والكحول والتي لا تذوب في الأيثر والبنزين . وأشارScalbert (24) إلى أن الفعالية السمية للتانينات قد تعود إلى كونها مادة غير منفذة للماء . فضلا أن الفعالية القاتلة لمستخلصات الشاي ضد الجراثيم قد تعود إلى إحتوائها على مادة catechin التي تحطم طبقتي الدهون الفوسفاتية للغشاء السايتوبلازمي 0(29,23)

الصورة (2) تأثير التانينات المفصولة من الشاي بتراكيز مختلفة في النط المصلي O_{126} لجرثومة الـ ETEC مقارنة بالمضاد الحيوي Ceehalexin

تحديد التركيز المثبط الأدنى

Minimum Inhibitory concentration (MIC)

قُدّير التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلص الكحولي لنبات الشاي فضلاً عـن التانينات المفصولة منه التي أظهرت تأثيراً قوياً ضد السلالات المختلفـة لجرثومـة *E. coli* وكما موضح في الجدول (3) إذ حضرت التخافيف للمستخلصات الكحولية والتانينـات (2، 1 ،0.5 ، 0.25 ، 0.125 ، 0.0625) ملغم / سم^3 في وسـط المرق المغذي على التـوالي وبعد التحضـين بدرجة حرارة (37) م أظهرت النتـائج أن التركيـز المثبـ ـط الأدنـى للمسـتخلص الكحولي لنبات الشـاي كان مسـاوياً تقريباً لـ (0.25) ملغـم / سـم^3 فـي الأنماط المصلية O_{126} و O_{119} و O_{114} لجرثومة EPEC ، أما فيما يخص النمط المـصلي O_{111} فقد كان التركيز المثبـط الأدنى مسـاوياً تقريباً لـ (0.125) ملغم / سم^3 . وأما مـا يخص التانيـنات المفصولة من نبات الشاي فقد كان التركيز المثبـط الأدنى (MIC) لهـا في النمط المصلي O_{126} لجرثومة EPEC مسـ ـاوياً تقريباًلـ (0.125) ملغم / سـم^3 فـي حيـن كان الـ(MIC) في الأنماط المصلية O_{119} و O_{111} و O_{114} مساوياً تقريبـاً لـ ـ (0.25) ملغم / سم^3 . وكما موضح في الجدول (4) .

الجدول (4) : التركيز الأدنى المثبط (MIC) للمستخلص الكحولي والتانينات المفصولة من نبات الشاي في الأنماط المصلية المعزولة لجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء (EPEC) .

نوع المستخلص	الأنماط المصلية لجرثومة EPEC			
	O_{126}	O_{119}	O_{111}	O_{114}
المستخلص الكحولي للشاي	0.25	0.25	0.125	0.25
التانينات	0.125	0.25	0.25	0.25

الكشف عن المركبات الفعالة المفصولة من نبات الشاي

كُشف عن التانينات المفصولة من الشاي بإستخدام عدد من الكشوفات الكيميائية فضلا عن تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin – layer chromatography (T.L.C) ، اذ أثبتت المادة المفصولة قابليتها على الذوبان في الماء والكحول والأسيتون وعدم ذوبانها في الايثر والكلوروفورم وثنائي كبريتيد الكاربون والبنزين ، كذلك أثبتت قابليتها على التفاعل مع محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وخلات الرصاص من خلال تكوين راسب قهوائي ، كما إستطاعت المادة المفصولة تكوين راسب أسود مزرق من خلال تفاعلها مع محلول كلوريد الحديديك ، كما أظهرت نتائج الكشف عن التانينات المفصولة من نبات الشاي بإستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة والمذكورة في المواد وطرائق العمل ، بظهور بقعة بنية اللون وإن قيمة معدل سرعة الجريان (RF) لها مساوية تقريباً لـ (0.73) وهي مقاربة جداً لـ (RF) العينة القياسية للتانينات التي تساوي (0.75) وكما موضح في الجدول (5) والصورة (3).

جدول (5) يوضح قيمة Rf للتانين المفصول من نبات الشاي والعينة القياسية

المادة المفصولة	RF المقاسة	RF للعينة القياسية
التانين	0.73	0.75

الصورة (3) البقع الظاهرة للتانين المفصول من نبات الشاي وعينة النموذج القياسية باستخدام تقنية (T.L.C)

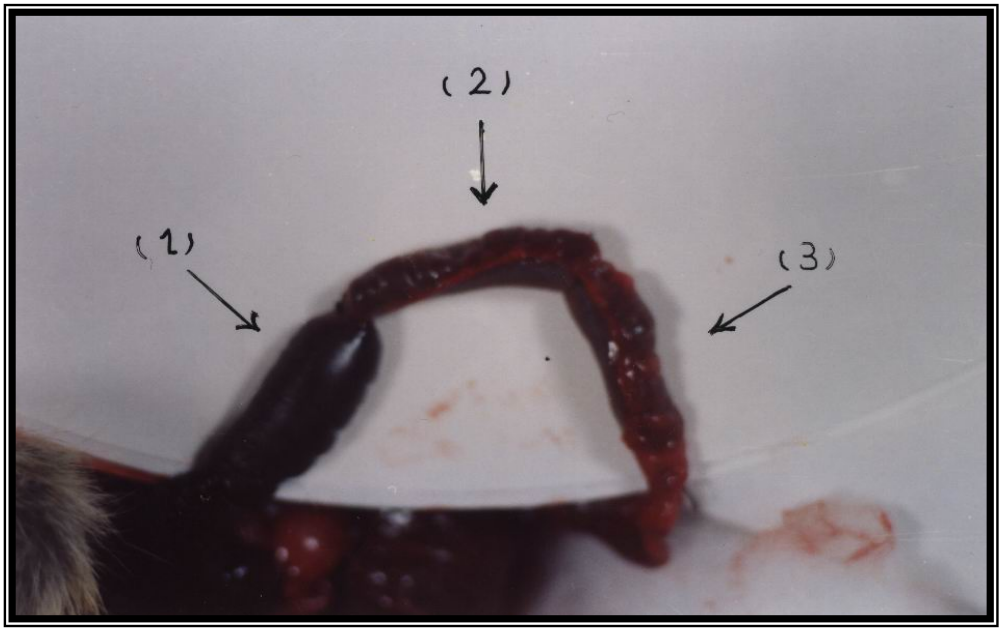
1- عينة النموذج القياسية

2- عينة التانين المفصول من نبات الشاي

التأثير التثبيطي للتانينات المفصولة من الشاي في نمو النمط المصلي O_{126} لجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للأمعاء داخل الجسم الحي *In vivo* .

أجري هذا الإختبار حسب طريقة الباحث Moon وجماعته (17) للكشف عن قابليـة الجراثيم على النمو والتكاثر داخل الأمعاء ، أعطت نتيجة الإختبار نتيجة موجبة وكما مبـين في الصورة (4) إذ تظهر قطع الأمعاء المربوطة التي حقنت القطعة الأولى منها بـ (1) سم^3 من المعلق الجرثومي الذي يعادل 10^{10} خلية / سم^3 والمخفف بنسبة 50% بإسـ ـتخدام محلول الملح الفسيولوجـي (NS) ، ويلاحظ فيه تمدد القطعة وتـضخمها نتيجـة لتجمـع السوائل ، وإن مؤشر التمدد بلغ (0.54) تقريباً وتتفق هذه النتائج مع مـا توصـل إليـه Sedlockو Deibel (30) اللذان أثبتا أن لعدد من سلالات جرثومة الايـشريكية القولونيـة القدرة على تجميع السوائل في أمعاء الأرنب المربوطة .

أظهرت القطعة الثانية (control) نتيجة سالبة وهي التي حقنت بـ(1) سم^3 مـن مرق نقيع القلب والدماغ ، إذ كان مؤشر التمدد مساوياً لـ (0.29) تقريبـاً ، أمـا القطعـة الثالثة التي حقنت بـ (0.5) سم^3 من المعلق الجرثـومي و (0.5) سـم^3 مـن التانينـات المفصولة ، فقد أظهرت نتيجة سالبة لاختبار أمعاء الأرنب المربوطة ، مما يدل علـى تـأثير التانينات المثبط لنمو جرثومة EPEC وتكاثرها ، اذ بلغ مؤشر التمدد (0.38) .



الصورة (4) توضيح لقطع أمعاء الأرنب المربوطة

1 - تمثل القطعة المحقونة بالمعلق الجرثومي .
2 - تمثل القطعة المحقونة بوسط (B.H.I) (السيطرة)0
3 - تمثل القطعة المحقونة بالمعلق الجرثومي + مستخلص التانينات .

المصادر:

1- شمس الدين ، احمد (2000). التداوي بالاعشاب والنباتات قديماً وحـديثاً . دار الكتـب العلمية ، ط1 . بيروت ، لبنان .

2- قطب ، فوزي طه .(1998) . النباتات الطبية: زراعتها ومكوناتها . دار المريخ , للنشر- الرياض0

3- قدامة ، احمد (1995) قاموس الغذاء والتداوي بالنبات ، دار النفائس ط8 ، بيروت .

4- Ocubo, S.; Ikigai, H.; Toda, M. and Shimamura. T. (1989).The anti-haemolysin
activity of tea and coffee. Lett. Appl. Microboil. 9: 65- 66.

5- Chakravarty, H. L. (1988). Medicinal plants of Iraq. Ministry of Agriculture
and agrarian reform, Baghdad.

6- هيكل ، محمد السيد . (1988) . النباتات الطبية والعطرية : كيميائها وانتاجها ، فوائدهـا .كليـة الزراعة / قسم البساتين / جامعة الالسكندرية0

7- Baron , E . J. and Finegold , S . M . (1990) . Baily and Scotts Diagnostic
Microbiology. 8th ed. C. V. Mosby Comp. USA.

8- Riose , J. L . ; Recio, M. C . and Villar , A . (1987) . Antimicrobial activity of
selected plant employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnopharmacol.,
21: 139-152.

9- Grand, A.; Woudergem, P. A.; Verpoortes, R. and Pousset, J. L.(1988). Anti-
infections phytotherapies of Tree savannah sengal (west-africa), II- antimicrobial
activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., 22: 25-31.

10- الرمضاني ،طلعت ابراهيم (1999) . دراسة كيميائية بعض النباتات العراقية التي تنمو في المنطقة الشمالية ، رسالة ماجستير,كلية العلوم جامعة الموصل ، العراق .

11 - Panshin , A.J. and Harrar , E.S (1962) . Forest production and Utilization
,McGRAw-– hill Book company , USA .

12- Shriner , R.L ; Puson , B.C and Curtin , d.y (1964). Systematic ideatification
of organic compound . 5th . , John – Wiley and Sons , Inc .

13 - Harborne, J. B.(1973). Phytochemical methods.Agide to modern technique of
plant analysis, Ist.ed. Printed inGreat Britain Cox and Wyman Ltd.,London.

14- Bauer,A.;Kirbay,W.;Sherris,J.andTurk,M.(1966). Antibial susceptibility by astandardized single disc method. Am.J.Clin.Pathol.,45: 493-496.

15 - Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (1996). Microbiology 3rd ed.
WCB.McGraw .Hill ,Lowa , USA.

16- Vandepitte, J.; Engback, K; Piot, P. and Heuk, C. (1991). Basic Laboratory
procedures in clinical bacteriology. World health organization , Geneva.

17- النعمان ، اديبة يونس شريف .(1998). التأثير الجزئي لبعض مستخلصات النباتية على نمو
وأيض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. رسالة دكتوراه ،كلية العلوم ،جامعة الموصل .

18- Moon, H. W.; Whipp, S. C.; Engstrom, G. W. Baetz, A. L. (1970). Response of
the rabbit ileal loop to cell – free products from *E. coli*: Enteropathogenic for
Swine. J. Infect. Dis. 121; 182-187.

19- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckeberger, P. C. and Win,
W. C. (1997). Color Atlas and text book of diagnostic microbiology. 5th ed., J.
B. Lippincott Raven publishers, Philadelphia.

20- الرحالي ، ابراهيم محمد خضر (1988) . بعض مظاهر الاشريكية القولونية الممرضة للامعاء
المعزولة من الاطفال المصابين بالاسهال وراقدين في المستشفى واطفال طبيعيين في دور الحضانة .
رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

21- Zvetkova, E.; wirleitner, B.; Tarm, N. T.; schennach, H. and Fuchs, D. (2001).
A aqueous extracts of crinum latifolium (L.) and *camellia sinensis* . Int.
Immunopharamacol., 1 (12): 2143-50.

22- Das, D. N. (1992). Studies on antibiotic activity of tea. J. Ind. Chem. Soc. 39:
849-854.

23- Ikigai, H.; Nakae, T. Hara, Y. and Shimamura, T. (1993).Bactericidal catechins
damaged the lipid bilayer. Biochem. Biophys. Acta. 1147: 132-136.

24- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. Photochemistry. 30: 3875-3883.

25- Cowan, M. M. (1999). Plant product as antimicrobial agent. Clin. Microbiol. Rev . 12(4): 564-582.

26- Nychas, G. (1995). Natural antimicrobial from plants. In: Gould, New
Methods of food preservation. Blackie Academic and Professional . , London,
pp.58-89.

27- Hattori, M.; Kusumoto, I. T.; Namba, T.; Ishagami, T. and Hara, Y. (1990).
Effects of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from
streptococcus mutans. Chem. Pharm. Bull. 38: 717-720.

28- Tylor, D.N. ; Bopp, C.A. ; Birkness, K. and Cohen, M.L. (1984). Anout break
of *Salmonella* associated with a fatality in ahealthy child : alarge dose and
severeillness. Am. J.Epidem., 119: 907-912.

29- Kawamura, J. and Takeo. (1989). Antibacterial activity of tea catechin to
streptococcus mutans. J. Jpn. Soc. Food soc. Technol. 36: 463-467.

30- Sedlock , D.M.; Deibel , R.H.(1978). Detection of *Salmonella* enterotoxin
using rabbit ileal loops . Can . J.Microbiol. 24:268-273 .