# تأثير انزيم اللايسوستافين والمستخلص المائي لنبات الميرامية على العزلة المقاومة لمضاد الفانكومايسين *Staphylococcus aureus* I1 المحلية

# Effect of lysostaphin and crude extract of *Salvia officinalis* on local isolate *Staphylococcus aureus* I1 resistant to vancomycin

**اسراء علي زيدان عبد الكريم عبدالرزاق القزاز علي صادق محمد**

قسم التقانة الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

**Issra'a Ali Zaidan Abdul Kareem A.AL-Kazaz,**

**Ali Sadik Mohammed**

Biotechenology Dept. / College of science/ University of Baghdad

**المستخلص:**

**تضمنت هذه الدراسة تحديد تأثير انزيم اللايسوستافين والمستخلص المائي الخام لنبات الميرامية لوحده و مع مضاد الـ vancomycin على نمو العزلة *S.aureus*I1 المعزولة من حالات التهاب نخاع العظم والمقاومة لمضاد الـ vancomycin ، اذ تـم استخـلاص اورا ق نبات الميرامية مائياً ووجد انـه يحتوي علـى الكلايكوسيدات والراتنجـات والتانينات والصابونينيات والفلافونات ولا يحتوي على القلويـدات واظهرت النتائج ان تركيز 15.25 مليغرام /مليلتر (يمثل قيمة الـ MIC) من المستخلص المائـي الخام لنبات الميرامية قد ثبط نمو هذه العزلة مرئياً ، و ان العلاج الخلطي باستخدام المستخلص الخام لنبات الميرامية ومضادالفانكومايسين سـبب زيادة فعالية مضاد الفانكومايسيـن بمقدار 260 مرة (بوجود 470 مايكروغرام / مليلتر من المستخلص النباتي) ، في حين ان تركيز 20 مايكروغرام / مليلتر من انزيم اللايسـوستافين ثبط نمـو هـذه العـزلة .**

**Abstract**

**This study included determining the effect of lysostaphin enzyme, and crude extract of *Salvia officinalis* and the combination of the crude extract of *Salvia officinalis* with vancomycin, on growth of the *S.aureus* I1 isolate which is isolated from patients with osteomyelitis and resistant to vancomycin, the results showed that : water crude extract have many active compounds like glycosides, tannins, saponeins, flavonides, resins, volatiles oil, but no alkaloids were detected. The 15.25 mg/ml was the best concentration from crude extract of *Salvia officinalis* that inhibits growth of the isolate. The crude extract of *Salvia officinalis* increased in action of vancomycin in 260 times (in presence of 470 µg/ml) crude extract the concentration of lysostaphin 20µg/ml inhibits growth of S.aureus I1.**

**المقدمة:**

ان الزيادة المستمرة لظهور المقاومة لمضادات الحياة جعلت من الضروري ايجاد وسائل جديدة لعلاج الاصابات ببكتريا *S.aureus* التي زاد خطرها في الوقت الحاضر مـن خـلال مقاومتها لمضاد الـ Vancomycin الذي كان يعد مضاداً فعالاً ضد هذا النوع من البكتريا بعد ان اظهرت مقاومة عالية لمضاد الـ Methicillin

[2،1] لذا اجريت العديد من البحوث العلمية التي تهدف الى ايجاد علاج بديل عن استخدام مضادات الحياة بالكيفية المعروفة بعد ان ثبت عدم قدرتها على علاج العديد من الاصابات بالبكتريا المقاومة له [ 3] لذا لجأ الباحثون الى مستخلصات نباتية ذات طبيعة علاجية مدروسة لمحاولة السيطرة على الممرضات المختلفة [ 4] كذلك محاولة لايجاد طريقة لتفعيل دور المضادات ضد هذه العزلات ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحياة [ 5] خصوصاً بعد ان ازدادت نسبة ظهور مقاومة بكتريا *Enterococcus faecalis* و *S.aureus* لمضاد الـ Vancomycin في الاونة الاخيرة بصورة كبيرة اذ ازدادت نسبة المقاومة لهذا المضاد بين (0.4 و 28.4) % للفترة مابين (1989و 2003) . اذ تعد كل من بكتريا *E.faecalis* و *S.aureus* من الممرضات المسببة لاصابات المستشفيات (Nosocomial infection) واصابات مرضية خطيرة اخرى مثل التهاب شغاف القلب [ 6] لذا لجأ الباحثون الى دراسة تأثير المزج بين المستخلص النباتي الخام (أو مواده الفعالة) مع مضادات حياة مختلفة حيث اظهرت النتائج ايجابية تأثير المزج بين المواد الفعالة لبعض المستخلصات النباتية مع مضادات الـ β-lactam اذ ان له دور فاعل ضد بكتريا الـ *S. aureus* Methicillin Resistant ( MRSA ) [ 7] وكذلك فقد توجهت الانظار الى استخدام انزيم اللايسوستافين كمادة علاجية فعالة ضد الاصابة بهذا النوع من البكتريا [ 1] ان لهذا الانزيم القدرة على تحليل الاصرة الببتدية (peptide bond) بين الحامض الاميني كلايسين (Glycine) وكلايسين اخر في جسور الكلايسين الخماسية الموجودة في طبقة الببتيدوكلايكان لجدار المكورات العنقودية عموماً ولبكتريا *S.aureus* بصورة خاصة[ 9،8 ] ويعود الاهتمام باستخدام انزيم اللايسوستافين علاجاً للاصابات المختلفة التي تسببها بكتريا *S.aureus* الى تخصصه العالي للهدف المطلوب وكذلك لقلة السمية او الاعراض الجانبية المرافقة لاستخدامه كمادة علاجية ، لقد اعطت هذه الدراسات الارضية الخصبة لبحوث مستقبلية واعدة بهذا المجال [ 10] . لذا هدفت هذه الدراسة الى اختبار فعالية انزيم اللايسوستافين والمستخلص الخام لاوراق نبات الميرامية لوحدها وبعد مزجها مع مضاد الـ Vancomycin على العزلة المحلية *S.aureus*I1 ذات المقاومة المتعددة والعالية لمضادات الحياة وخصوصا مقاومتها لمضاد الـ Vancomycin .

**طرائق العمل :**

**العزلة البكتيرية** : تم اعتماد المعزلة *S.aureus*I1 المعزولة من حالات التهاب العظام من مستشفى الواسطي في بغداد .

**المواد :** تم الحصول على انزيم اللايسوستافين من شركة سكما ، والمواد الكيمائية المختلفة لغرض الكشف عن المواد الفعالة للمستخلص المائي لنبات الميرامية .

**تحضير المستخلص النباتي لنبات الميرامية :** حضر المستخلص الخام لاوراق نبات الميرامية *Salvia officinalis* بحسب [11] وذلك بوضع 50 غم من اوراق نبات الميرامية الجافة والمطحونة داخل كشتبان (Thimble) في جهاز (Soxhlet) واضيف له 250 مليلتر من الماء المقطر بدرجة حرارة تقارب 45 م وترك النموذج لمدة 8 ساعات ، ثم جمع المستخلص المائي في الدورق (Flask) ، وبعدها ركز المستخلص المائي بوضعه في الحاضنة بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، وبعد التخلص من الماء وزن المستخلص النباتي الخام .

الكشف الكيميائي لبعض المكونات الفعالة بايولوجيا في نبات الميرامية :اذ تم اعتماد الطرق الكيمائية المختلفة للكشف عن المواد الفعالة الموجودة بالمستخلص المائي لنبات الميرامية باعتماد كلوريد الالمنيوم وكاشف ماير وكلوريد الالمنيوم وكلوريد الزئبقيك وكلوريد الحديديك وحامض الهيدروكلوريك وكاشف كيد على وفق ما ذكر في [ 13،12] .

**اختبار تأثير المستخلص الخام لوحده وبعد مزجه مع مضاد الفانكومايسين في نمو بكتريا *S.aureus* I1 :**

اجري هذا الاختبار باعتماد الـ MIC حسب ماذكر [ 14] للمستخلص النباتي لوحده ومع مضاد الـ Vancomycin على بكتريا حدد التركيز المثبط الادنى للمستخلص الخام لنبات الميرامية لوحده ومع مضاد الـ Vancomycin على بكتريا *S.aureus* (VRSA) باتباع الخطوات نفسها لتحديد قيمة الـ MIC لمضادات الحياة وتأثير الجمع بين المضادات وفقا لما ذكره[ 15] مع ابدال التراكيز المختلفة لمضادات الحياة بالتراكيز المختلفة من المستخلص النباتي الخام المحضر اذ استخدم التراكيز الاتية (0.9 ، 1.9، 3.81 ،7.625، 15.25 ، 30.5، 61، 122، 244 ) مليغرام /مليلتر مع تثبيت تراكيز مضاد الـ Vancomycin .

**اختبار فعالية انزيم اللايسوستافين على بكتريا *S.aureus*I1 (VRSA) بو اسط اختبار الـ MIC**

حضرت تراكيز مختلفة من انزيم اللايسوستافين كما يلي : (0،5،10،15،20،25 ) مايكروغرام / مليلتر. وذلك بتلقيح سطح الاكار (مولر –هنتون ) باستخدام ناشرزجاجي معقم بالعالق البكتيري الذي يحوي $1.5\times 10^{8}$ خلية / مليلتر حددت فعالية التركيز لانزيم اللايسوستافين بقياس قطر منطقة التثبيط المتكونة حول الانزيم مقدرة بالملميتر حسب الطريقة الواردة في [ 16] .

**النتائج والمناقشة :**

**تقدير نسبة المستخلص الخام لنبات الميرامية *Salvia officinalis***

تم اختيار نبات الميرامية لدراسة تأثير المستخلص المائي الخام لاوراقه في العزلة *S.aureus* I1 اذ يتوقع احتوائه على العديد من المواد الفعالة التي يحتمل ان لها تأثيراً في هذه البكتريا . حيث اشارت العديد من البحوث العلمية الى فعالية المستخلص الخام لنبات الميرامية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام بصورة خاصة [ 7] لقد تم الحصول على المستخلص المركز بوزن 1.5غرام اي بنسبة 3% . تم استخدام الماء المقطر كمذيب لأنه وحسب المصادر العلمية يضمن الحصول على اغلب المركبات الفعالة الموجودة في اوراق نبات الميرامية التي يحتمل انها تؤثر في نمو بكتريا *S.aureus* [ 17] .

**الكشوفات الكيميائية للمركبات الفعالة في المستخلص الخام لنبات الميرامية :**

وتم الكشف والتأكد من وجود المركبات الفعالة الآتية : كلايكوسيدات وتانينات وفلافونات وصابونينيات في حين كان خالي من القلويدات . كانت هذه النتائج مطابقة لما جاء به [ 18] وقد استخلصت هذه المواد الفعالة باستخدام الماء لكونها تذوب به [ 18] .

ولقد تم الاستدلال على هذه المواد الفعالة عن طريق تغير اللون عند اضافة الكشوفات الكيميائية حسب ما ذكر بالمصادر العلمية المختلفة ويمكن ملاحظة ذلك بالشكل (1) من خلال تغير لون المستخلص المائي من اللون البني الى الاصفر عند اضافة الكاشف المخصص للصابونينات شكل(A1-1) . و ظهور رغوة كثيفة تستمر لمدة طويلة عند رج الانبوبة الحاوية على المستخلص تدل على وجود الصابونينيات شكل (1- A2) . و في الكشف عن القلويدات،(شكل 1- B) فأن اضافة كاشف ماير الى المستخلص المائي للنبات لم يؤدي الى تكون الراسب الابيض الذي يعد دليلاً على وجود القلويدات مما يدل على ان المستخلص المائي للنبات لايحتوي على القلويدات . وعند الكشف عن الفلافونات ، شكل (1- C) تحول لون المستخلص النباتي لنبات الميرامية الى الاصفر مما يدل على وجود الفلافونات بصورة عامة .

اما في الكشف عن التانينات شكل (1- D) تكون اللون الازرق . وفي الكشف عن والراتنجات شكل (1- E) تكونت عكورة دلالة عن وجودها بالنموذج ، عند اضافة الكشوفات الخاصة بكل منهما دلالة على وجود هذه المواد في المستخلص المائي للنبات. تطلب الكشف عن الزيوت الطيارة فحص ورقة الترشيح المشبعة بالمستخلص المائي للنبات عن طريق تعريضه للاشعة فوق البنفسجية وقد دل ظهور اللون الوردي البراق على وجود الزيوت الطيارة في المستخلص الخام لنبات الميرامية .

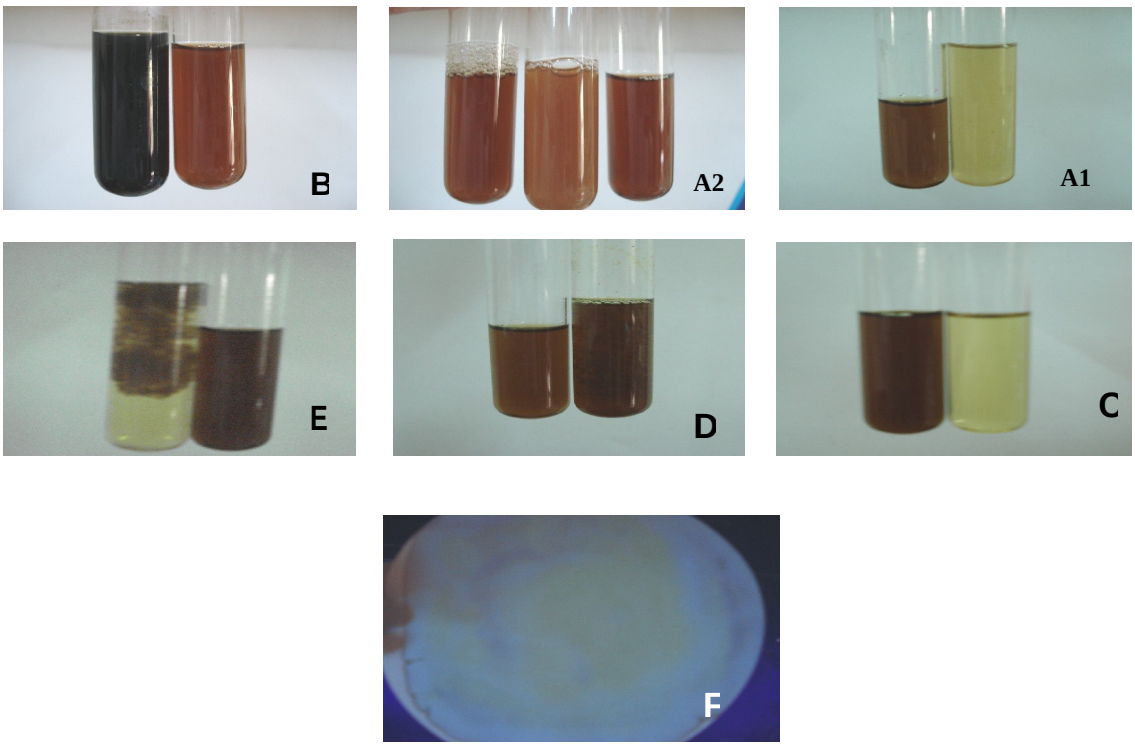
بينت نتائج الكشف الكيميائي امكانية استخدام هذا المستخلص المائي في تثبيط نمو الاحياء المجهرية ، وذلك لاحتوائه على المركبات الفعالة حيوياً مثل الكلايكوسيدات والتانينات التي تمتلك خواص مطهرة ومعقمة فضلاًعن كونها مركبات مضادة للبكتريا [ 19] .

**اختبار التركيز المثبط الادنى للمستخلص الخام لنبات الميرامية:**

اختبرت فعالية المستخلص الخام لاوراق نبات الميرامية ضد العزلة *S.aureus* I1 المقاومة لجميع مضادات الحياة في هذه الدراسة باعتماد اختبار (MIC) للمستخلص فقد اظهرت النتائج ان هذه العزلة ثبطت مرئياً عند تركيز (15.25 مليغرام / مليلتر ) حيث ان هذه النتيجة جاءت تزيد عن ما توصل اليه [ 15] الذي ذكر ان البكتريا قد ثبطت بتركيز يتراوح بين (5- 10 مليغرام /مليلتر) . وقد يرجع السبب في الاختلاف بين النتائج الى مصدر العزلات البكتيرية واختلافها من ناحية التركيب الوراثي . ان احتواء المستخلص الخام على الكلايكوسيدات والتانينات ممكن ان يكون السبب في تاثيره في نمو *S.aureus* بوصف هذه المركبات مضادات ومواد مطهرة ومعقمة [ 20] وكذلك فأن احتواء المستخلص الخام على الفلافونات والزيوت الاساسية فله دور مهمٌ كمضادات بكتيرية [ 5] ، كما ان تأثير المستخلص الخام في بكتريا *S.aureus* ممكن ان يعود سببه الى انها بكتريا موجبة لصبغة غرام التي يتميز غشائها البلازمي بنفاذيتهُ الجيدة للجزيئات الكبيرة والمتمثلة بالمواد الفعالة (في هذه الحالة) وبما ان لهذه المواد دوراً ضد مايكروبي طبيعي فبذلك يحدث التأثير في البكتريا . وهذا ما اكده[21 ] الذي وجد ان للمستخلص الخام لنبات الميرامية القدرة على تثبيط نمو البكتريا الموجبة اكثر من فعاليته في البكتريا السالبة لصبغة غرام الذي عزى السبب في ذلك الى امتلاك الغشاء البلازمي لبكتريا السالبة لصبغة غرام لصفة التأثير المنخلي الذي لا يسمح بمرور الجزيئات الكبيرة خلاله .

**اختبار فعالية الجمع بين المستخلص الخام لنبات الميرامية ومضاد الـ Vancomycin على نمو بكتريا I1 *S.aureus***

اظهرت نتائج المزج بين المستخلص الخام لنبات الميرامية ومضاد الـ Vancomycin زيادة فعالية الاخير وذلك بانخفاض قيمة MIC لـه بمقدار 32 مرة حيث اصبحت 19.53 مايكروغرام / مليلتر (بعد ان كانت 625 مايكروغرام/مليلتر ) بوجود 470 مايكروغرام / مليلتر من المستخلص الخام لنبات الميرامية . وبذلك اصبحت البكتريا حساسة لهذا المضاد حسب قيم MIC القياسية . ان نجاح تاثير المزج بين المواد الطبيعية المتمثلة بالمستخلصات النباتية مع مضادات الحياة في نمو بكتريا *S.aureus* جاء مؤيدا لـ[ 4] الذي اختبرفعالية المزج بين مضاد الـ Vanconycin والمستخلص النباتي Mangostin- [Alpha] على بكتريا(VRE) *E.faecalis* وبكتريا *S.aureus* المقاومة لمضاد الـ Methicillin (MRSA) حيث حقق نسبة تثبيط جيدة لكلا النوعين . ممكن ان يعود سبب تأثير المستخلص الخام على البكتريا المدروسة الى زيادة نفاذية غشائها البلازمي للمضاد اوقد يعود السبب الى احتواء هذا المستخلص على المواد الفعالة المختلفة والتي لها تاثير ضد مايكروبي قوي ، اذ ثبت ان لها القدرة على تقليل قيمة MIC لكل من مضاد Erythromycin و Tetracycline و Gentamicin و Streptomycin بمقدار يتراوح بين (4-8) مرة . ان تأثير المستخلصات النباتية على الانواع البكتيرية يتم باليات مماثلة لعمل مضادات الحياة على البكتريا ، اذ تعمل على تثبيط بناء الجدار الخلوي للبكتريا ، او تثبيط صنع البروتين والاحماض النووية التي تحتاجها الخلايا البكتيرية بصورة اساسية ، او تثبيط صنع الغشاء البلازمي [ 22] . ان الاصابة بانواع بكتيرية مقاومة لمضادات الحياة بمستويات MIC عالية جعلت العلاج محدد وصعب لمثل هذه الحالات لذا كان من الضروري ايجاد طريقة تدعم فعل هذه المضادات ليضمن علاج هذه الاصابات . لذا يمكن ان تندرج هذه المحاولة ضمن المحاولات العديدة لتنشيط فعالية المضادات التي قد تكون ذات تأثير متغاير لانه يهدف للتأثير في حساسية البكتريا .




**الشكل (1): الكشوفات الكيمياوية للمركبات الفعالة في المستخلص الخام لنبات الميرامية**

**A1 ، A2 :- اختباري الكشف عن الصابونينيات** **B :- اختبار الكشف عن القلويدات**

**C:- اختبار الكشف عن الفلافونات** **D :- اختبار الكشف عن التانينات**

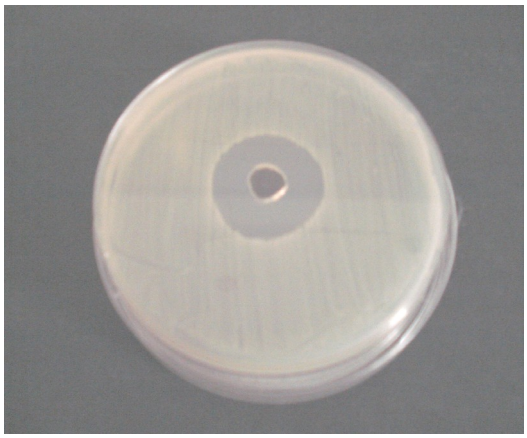
**E:- اختبار الكشف عن الراتنجات** **F :- الكشف عن الزيوت الطيارة**

**اختبار التركيز المثبط الادنى (MIC) لانزيم اللايسوستافين على نمو العزلة *S.aureus* I1**

اختبرت فعالية انزيم اللايسوستافين باعتماد اختبار MIC على العزلة *S.aureus* I1 حيث اظهرت النتائج ان تركيز 20 مايكروغرام/مليلترمن الانزيم يثبط نمو هذه العزلة بقطر تثبيط بلغ 27 ملم كما مبين بالشكل (2) .

اظهرت هذه النتيجة زيادة بمقدار الضعف في قيمة الـ MIC عن ما وجده[ 10] الذي بين ان 10 مايكروغرام /مليلتر سببت تحلل لبكتريا *S.aureus* المقاومة لمضاد Vancomycin بينما وجد[ 15] ان تركيز 2.5 مايكروغرام /مليلتر من انزيم اللايسوستافين كافٍ لتحليل بكتريا *S.aureus* الحساسة لكل من مضاد الـ Vancomycin و الـ Methicillin .

وقد يرجع السبب في توافق المقاومة لمضاد الـ Vancomycin والمقاومة لانزيم Lysostaphin الى حدوث طفرة في الجينات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي مما يتطلب تراكيز عالية من انزيم Lysostaphin لكي يحلل بكتريا *S.aureus* [ 10] او قد يعود السبب الى حدوث طفرة تؤدي الى تقليل تكوين الارتباطات العرضية ( Cross linking ) التي تعد الموقع الفعال التي يعمل عليها كل من مضاد الـ Vancomycin وانزيم الـ Lysostaphin [23،24] اذ ان الالية التي يؤثر بها انزيم الـ Lysostaphin على بكتريا *S.aureus* تكون من خلال قدرته على تحليل جدار هذه البكتريا عن طريق تحطيم الاصرة الببتيدية بين الحامض الاميني كلايسين وكلايسين اخر في جسور الكلايسين الخماسية في طبقة الببتيدوكلايكان [ 25] على الرغم من ان التركيز المطلوب من انزيم الـ Lysostaphin ليس بالقليل للتأثير في العزلة المدروسة لكنه يعد بالرغم من ذلك علاجاً بديلاً ناجحاً وجيد ضد الاصابة بمثل هذه البكتريا لانه يعمل على هدف متخصص جدا (الجدار لخلوي للبكتريا) و سمية تكاد تكون معدومة بالنسبة للمضيف[26 ] .



**الشكل (2): تثبيط نمو العزلة *S.aureus* I1 بتركيز 20 مايكروغرام /مليلتر من انزيم اللايسوستافين، على وسط مولر هنتون اكاربدرجة حضن 37 م ولمدة 24 ساعة**

**المصادر :**


1. Hiramatsu,K.;Cui,L.;Kuroda,M.;and Ito,T. (2001) . The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends.Microbiol., 9 : 486 - 493.
2. Smith,T.L.;Pearson,M.L.;Wilcox,K.R.;Cruz,C.;Lancaster,M.V.; and Jarvis ,W.R. (1999). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*.N .Engl .J. Med., 340 : 493 -501.
3. Chambers, H. F . (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* ?.J.Infect.Dis.,7 (2) : 178 – 182.

4. Urban; and Verlag,F.(2005). Antimicrobial activity of [alpha] –mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics . J. of Phytotherapy and Phytopharmacology., 4 (250): 1 - 2.
5. Dan,L.(1997). Herbs for treatment of various infections.Nutrition Science News .,34-36.
6. Zy,E.;Aera,S.;and Aam,K. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine.J.Med.Sci.,21(2): 93-187.
7. Fujita,M.;Shiota,S.;Kuroda,T.;Hotano,T.; Yoshida, T. ; and Tsuchiya ,T.(2005). Treatment of infection .Microbial Immunol .,49 : 391- 396
8. Browder, H . P. ;Zygmunt,W . A. ;Young , J . R. ; and Travormina,P.A. (1965).Lysostaphin enzymatic mode of action . Biochem . Biophys. Res Comm., 19 : 383 - 389.
9. . Schaffner,W.; Melly,M.A.; and Koenig,M.G.(1967). Lysostaphin : an enzymatic approach to *Staphylococcal* disease.II. *In vivo* studies,J.Biol.Med., 39 : 230 – 244
10. Gröndling A.;Missiakas,D.M.;and Schneewind ,O. (2006). *Staphylococcus aureus* mutant's with increased lysostaphin resistance.J. Bacteriol., 188 (17) : 6286 – 6297.
11. Nadir, M.T.;Salih ,F.M.;Dhahir ,A.J.;and Hussain,A. M.(1989). Antimicrobial activity of *Salvia* species indigenous to Iraqi .J. Bio.S.R., 17 : 109 – 117.
12. Indian herbal Pharmacopoeia. (1998) .A joint publication of regional research laboratory, council of scintific and industrial research. Jammutans., 1 : 1 – 10 .
13. Shihata,I.M. (1951). A pharmacological study of *Angallis arvensis* .M.D.Vet . Thesis. Cario University. Egypt
14. Baron, E.J.; Pelerson, L. R.; and Finegold, S.M. (1994*). Enterobacteriaceae*.In : Baiely and Scott's Dagnostic Microbiology,(9th ed.), Mosby –year book Inc,USA.
15. Amabeoku,G.J.;Eagles,P.,Scott,G.;Springfield,E.P.; and Mayeng, I. (2001). Analgesic and antipyretic effects of *Dodonaea angustifolia* and *Salvia africana–lutea* .J.Ethnopharam.,75 (2/3) : 117 - 124.
16. Kusuma,C.M.;and Kokai-kun,J.F. (2005). Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various trains of *Staphylococcus auerus* .J. Antimicrob.Agents Chemother., 49 (8) : 3256 – 3262.
17. Capek, P.; and Hribalova , V . (2004) .Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. Possessing immunomodulatory activity. Phytochemistry., 65 : 1983-1992.
18. Paula, C.S.;Seabra, R.M.;and Andrade, B.(2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage *Salvia officinalis.* J. Plant Science. 162: 981 – 987.
19. Santos-Gomes,P.C.;and Fernandes-Ferreira,M. (2001) . Organ and season dependant variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L.cultivated at two different sites .J. Agricultural and Food Chemistry. , 49: 2908 - 2916.
20. Sivropoulou,A.; Nikolaou,C.; Papanikolaou,E. ; and Arsenakis,M. (1997). Antimicrobial,cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fructicosa* essential oil .J.Agric.Food .Chem.,45 : 3197 – 3210.
21. Ulubelen,A.(2003).Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species .Phylochem., 64 (2) : 395-399.

22. Laurance, D. R.; Bennett, P.N.; and Brown, M. J. (1997). Clinical pharmacology. (8th ed.) Churchill Livingstone. London. 250-260.
23. .Patron, R. L.; Climo, M. W.; Goldstein, B. P.; and Archer, G. L. (1999). Lysostaphin treatment of experimental aortic valve endocarditis caused by a *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin . Antimicrob . Agents Chemother., 43:1754 - 1755
24. Pfeltz, R. F.; Singh, V. K.; Schmidt, J. L.; Batten, M.A.; Baranyk, C. S.; and Wilkinsin,B.J. (2000).Characterization of passage selected vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental back grounds. Antimicrob.Agents Chemother., 2:166-171.
25. Dajcs,J.J.; Hume,E.B.H.; Moreau,J.M.; Caballero,A.R. ; and O'callaghan, R .J. (2000). Lysostaphin treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbit. Arch. Ophthalmol. 41: 1432 - 1437
26. Bannerman, D.; and Wall,R.J. (2005). Anovel strategy for the prevention of *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows . Agricultural Research Service., 31: 301-312.