

تأثير ثنائي الاستيل على البكتريا المعزولة من إصابات القناة التنفسية⁺

خالدة كريم الكريمي*

زهرة محمود الخفاجي**

Effect of deacetyl on Bacteria Isolated from Respiratory Tract

الخلاصة

تم الحصول على ٦١ عزلة من إصابات الجهاز التنفسي للفترة من اذار / ٢٠٠٢ الى نهاية كانون الثاني / ٢٠٠٣. شكلت عزلات نماذج الفشع ٩٥%، في حين كانت عزلات مسحات اللوزتين 1,6% وغسيل القصبات 3.3%. كانت البكتريا السالبة لصبغة كرام 88.5% والموجبة لصبغة كرام 5.11%. ظهرت *Klebsiella* بأعلى نسبة من السالبة لصبغة كرام ٢٤% تلتها *Moraxella catarrhalis* 22.2%. ثم بكتريا *Escherichia coli* 18.5%. تميزت اغلب العزلات بمقاومتها لواحد او اكثر من المضادات الحيوية، وكانت عزلتان مقاومة لسبعة من المضادات الحيوية وهي تعود الى جنس *Klebsiella* (عزلة رقم 16A) والأخرى تعود الى *Enterobacter* (عزلة رقم ٢٥)، فيما كانت إحدى العزلات وهي *Staphylococcus aureus* (عزلة رقم ١٩) مقاومة لتسعة مضادات حيوية.

درس تأثير ثنائي الاستيل باستعمال طريقة الانتشار في الحفر باستعمال وسط Muller-Hinton agar في أطباق قطرها ٩ سم وعمق الوسط فيها ٤ ملم، وأضيفت تراكيز ثنائي الاستيل ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مايكروغرام. أظهرت النتائج ان الأغلبية العظمى من البكتريا حساسة جدا للمركب خاصة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية. أظهرت البكتريا الموجبة نسبة من المقاومة أعلى من البكتريا السالبة لصبغة كرام، اذ كانت عزلة واحدة من سبعة عزلات موجبة لصبغة كرام مقاومة لجميع التراكيز المستعملة (14.3%) في حين كانت النسبة 1.7% (عزلة واحدة من ٥٤ عزلة). تم مناقشة تأثير مركب ثنائي الاستيل واقترح استعماله بطريقة الاستنشاق لمعالجة إصابات الجهاز التنفسي بعد استكمال متطلبات مثل هذا الاستعمال.

Abstract

Sixty one isolates were obtained from respiratory tract infections during the interval: March /2002 to January/2003. Samples were sputum (95%), throat swabs 1.6%, bronchial wash 3.3%. Most of the isolates were G-ve 88.5% and the rest were G+ve. *Klebsiella* represented the highest percentage among the G-ve 24%; followed by *Moraxella catarrhalis*, 22% then *Escherichia coli* 18.5%. Majority of isolates were resist to one or more antibiotics, some are resist to 7 antibiotics as in the *Klebsiella* isolate # 16A and *Enterobacter* isolate # 25, one of staphylococcal isolate # 19 was resist to 9 antibiotics.

The effect of diacetyl on these isolates was studied by agar diffusion method using Muller-Hinton agar at 4 mm depth in Petri dish with 9 cm diameter. Diacetyl applied at 30, 60, 120, 180 µg per 5mm diameter well of surface cultivated plates.

Results revealed that most of the isolates were sensitive to diacetyl especially those resist to large number of antibiotics. G+ve bacteria showed some resistance 14.3% (one isolate out of seven); while G-ve showed only 1.7% (one isolate out of 54).

⁺ تاريخ الاستلام بلا تاريخ القبول ٢٨ / ٢ / ٢٠٠٤

^{**} استاذ/ معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا جامعة بغداد

* مدرس مساعد كلية الطب جامعة بغداد

The mechanism of diacetyl action has been discussed and suggestion for using diacetyl as aerosol for treatment of respiratory tract infections was put forward after completion of requirement for such use.

المقدمة

تشكل إصابات القناة التنفسية وملحقاتها مشكلة كبيرة وقد تصل الوصفات الخاصة بعلاجها بالمضادات الحيوية إلى ٧٥% من مجمل الإصابات [1] ، ففي الهند تصل هذه الإصابات إلى ٢٠-٤٠% للمرضى العاديين وقد تصل إلى ١٢-٣٥% من المرضى الراقدين في المستشفيات [2]. وتظهر الإصابات والتعقيدات نتيجة الإصابة بالعديد من الأحياء تأتي الفيروسات في مقدمتها، أما البكتيريا فتتمثل بشكل رئيسي ببكتريا *Moraxella* ، *Streptococcus pneumoniae* ، *Pseudomonas catarrhalis* ، *Haemophilus influenzae* بالإضافة إلى بكتريات أخرى مثل *Staphylococcus aureus* ، *aeruginosa* [2]. وقد أصبح العديد منها مقاوماً للمضادات الحيوية قيد الاستعمال وأهمها مجموعة β -Lactam , Tetracyclines , Macrolides وغيرها [3] . ومن جهة ثانية هناك بعض المركبات التي تعد من المضافات الغذائية الطبيعية للأغذية مثل ثنائي الاستيل الذي يمثل مركبات النكهة في الزبد وينتج من قبل مجموعة خاصة من بكتريا حامض اللاكتيك [4]. وللمركب قابلية تثبيط عالية للعديد من الأنواع البكتيرية [5,6,7,8] ، ويصنف المركب ضمن المواد الآمنة (GRAS) ضمن ضوابط منظمة FDA كما أنه ليس له القابلية على حث الأورام [9]. وفي دراسات سابقة تم التحري عن قابلية المركب على تثبيط عدد من البكتريا المسببة للإصابات الجلدية السطحية (دراسة تحت النشر).

وتستهدف الدراسة الحالية معرفة تأثير ثنائي الاستيل على البكتريا المعزولة من إصابات الجهاز التنفسي حيث يذكر أن المركب يوجد في بعض أنواع الخشب وتستهمله بعض شعوب الدول الإسكندنافية في الطب الشعبي لعلاج إصابات الجهاز التنفسي [10] .

المواد وطرق العمل

العزلات البكتيرية: جمعت من نماذج مختلفة هي القشع، مسحة اللوزتين وغسيل القصبات للفترة من آذار/٢٠٠٢ إلى نهاية كانون الثاني ٢٠٠٣ من مختبرات مدينة صدام الطبية وتم تشخيصها وتحديد حساسيتها للمضادات الحيوية (Antibiogram).

مركب ثنائي الاستيل Diacetyl: تم الحصول عليه من شركة Fluka.

تقدير الفعالية التثبيطية لثنائي الاستيل خارج الحي: بعد إجراء التجارب الأولية تم تحديد التراكيز الملائمة ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مايكروغرام، حضرت في ماء مقطر معقم دافئ (٣٠-٣٥م).

حضرت أطباق بقطر (٩ سم) صب فيها Muller-Hinton agar بعمق ٤ ملم ونشر على سطحها خلايا مزروع ليلي في المرق المغذي (Oxoid-Nutrient broth) بعد تخفيفه ١: ١٠٠ في محلول الملح الفسلي واستعمل ٠,٢ مللتر لكل طبق ، ثم عملت حفر بقطر ٥ ملم ملئت بـ ٥٠ مايكرو لتر [11] حفظت الأطباق لمدة ساعة بدرجة حرارة التلاجة ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧م لليوم الثاني. وعندما تكون العزلة حساسة يحضر كل تركيز في طبق خاص به . قرأت النتائج بقياس أقطار مختلفة لمنطقة تثبيط النمو واستخراج المعدل ، أعيدت التجربة لمرتين وبمكررين .

النتائج والمناقشة

يوضح جدول (١) العزلات المستعملة والنماذج المأخوذة منها والمضادات الحيوية المقاومة لها.

جدول (1): العزلات المستعملة في الدراسة ومصادرها والمضادات الحيوية المقاومة لها.

| المضادات الحيوية | رقم العزلة وتشخيصها | مصدر العزلة |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| <i>M. catarrhalis</i> | | قشع Sputum |
| ⁽¹⁾ - | 1 | |
| Am, Te, Axm | 2 | |
| - | 2A | |
| Am, Te,Co, Axm | 4 | |
| - | 4A | |
| Am, Te, Axm | 5 | |
| Te, Axm | 6 | |
| Co | 7 | |
| - | 11 | |
| - | 17 | |
| Co | 18 | |
| - | 21 | |
| <i>Streptococcus</i> | | |
| - | 10 | |
| <i>Streptococcus</i> | | |
| - | 1(+) | |
| - | 2(+) | |
| - | 3(+) | |
| Tm | 7(+) | |
| Te,C,P,Ac,Cfm,Ca,Gm, An, Cf | 19(+) | |
| Am,Gm,Ce,Cf | 21(+) | |
| <i>H. influenzae</i> | | |
| Am,An | 5 | |
| - | 8 | |
| Te,Co | 9 | |
| E | 15 | |
| <i>Klebseilla</i> | | |
| Gm,Tm | 1 | |
| Ac,Ca,Ce | 1A | |
| Te,Gm | 10 | |

| | | |
|-----------------------|-----|--|
| Tm,Ac,Ca,Gm,Cf | 10A | |
| Te,Co | 13 | |
| Ac,Am | 14 | |
| Am | 14A | |
| Te,Gm,Tm | 14B | |
| - | 15 | |
| Cf,Co | 16 | |
| Am,Ac,Co,Gm,Ce,An,E | 16A | |
| Co,Cfm,Ca,An,Cf | 18 | |
| Ce,Cfm,Ca,An,Cf | 20 | |
| <i>Ps. aeruginosa</i> | | |
| Axm | 2 | |
| Axm | 3 | |
| Te | 4 | |
| Te,Axm | 9 | |
| <i>Proteus</i> | | |
| Gm,Tm,Axm | 2 | |
| Gm,Tm,Axm | 4 | |
| <i>Enterobacter</i> | | |
| - | 4 | |
| - | 5 | |
| Cro,Ac,Cfm,Ca,Cf | 23 | |
| Am,Ac,Ca,Gm,An,Ce,Cf | 25 | |
| <i>E. coli</i> | | |
| Am,Ac,Cfm,Gm,Ce,Cf | 3 | |
| - | 12 | |
| Am,Ca,Gm | 12A | |
| - | 13 | |
| Ac,Ca,Gm,An | 14 | |
| - | 22 | |
| Am,Cfm,Ca,Ce,Cf | 22A | |
| Axm,An | 39 | |
| - | 45 | |

| | | |
|--------------------|----|--|
| - | 45 | |
| <i>Serratia</i> | | |
| Cro,Am,Ac | 1 | |
| An | 3 | |
| <i>Klebsiella</i> | | |
| Gm,Tm | 20 | |
| <i>Pseudomonas</i> | | |
| Axm,An | 5 | |
| Axm,An | 6 | |

(١) لم يجر الفحص لعدم توفر اقراص المضادات الحيوية عند ورود النماذج

(٢) + السلالة موجبة لفحص Coagulase

المضادات الحيوية المستعملة وتركيزها/قرص

Ac; Augmentin, 30µg. Am; Ampicillin, 10µg. An; Amikacin, 30µg. Axm; Amoxicillin, 10µg. Ca; Ceftazidime, 30µg. Ce; Cephataxin, 30µg. Cf; Ciprofloxacin, 5µg. Cro; Ceftriaxone, 30µg. Co; Co-teimoxozole, 25µg. C; Chloramphenicol, 30µg. E; Erythromycin, 5µg. Gm; Gentamycin, 10µg. P; Penicillin, µg. Te; Tetracyclin, 10µg. Tm; Tobramycin, 10µg. Cfm; Cefixime, 5µg.

وتشير النتائج الى انه امكن الحصول على ٦١ عزلة كانت سبعة منها بكتريا موجبة لصبغة كرام (11.5%) في حين كانت الباقي سالبة لصبغة كرام. ومن بين البكتريا السالبة لصبغة كرام كانت *Klebsiella* في المقدمة ٢٤% تلتها *M. catarrhalis* 22.2% ثم *E. coli*. كانت معظم العزلات مقاومة لمضاد حيوي واحد او اكثر (بغض النظر عن العزلات التي لم يجر لها فحص الحساسية للمضادات لعدم توفرها)، فقد بلغت نسبة العزلات المقاومة لمضاد واحد 14.8% والمقاومة لثلاث مضادات 14.8% والمقاومة لاربعة مضادات ٥% وهناك عدد من العزلات المقاومة لخمسة مضادات، وعزلتين مقاومة لسبعة مضادات حيوية وعزلة واحدة مقاومة لتسع مضادات حيوية.

اما تأثير التراكيز المختلفة من ثنائي الاستيل على العزلات التي تم الحصول عليها فموضحة في جدول (٢).

جدول (٢): تأثير تراكيز مختلفة من ثنائي الاستيل على العزلات المستعملة في الدراسة.

| معدل قطر تثبيط منطقة النمو (ملم) (١) | | | | رقم العزلة ومصدرها |
|--------------------------------------|----------------|---------------|-------------------|--------------------|
| ١٨٠ مايكروغرام | ١٢٠ مايكروغرام | ٦٠ مايكروغرام | ٣٠ مايكروغرام | |
| <i>M. catarrhalis</i> | | | | قشع |
| NG | NG | NG | NG | ١ |
| NG | NG | NG | NG ^(٢) | 2 |
| 38 | 38 | 22 | 10 | 2A |
| NG | NG | NG | NG | 4 |

| | | | | |
|-----------------------|------|------|------------------|-------------------|
| NG | NG | NG | NG | 4A |
| NG | NG | NG | NG | 5 |
| NG | NG | NG | NG | 6 |
| NG | NG | NG | NG | 7 |
| NG | NG | NG | NG | 17 |
| NG | NG | NG | NG | 18 |
| 50 | 46 | 40 | 26 | 21 |
| <i>Streptococcus</i> | | | | |
| R | R | R | R ⁽³⁾ | 10 |
| <i>Staphylococcus</i> | | | | |
| NG | NG | NG | NG | 1(+) ⁴ |
| NG | NG | NG | NG | 2(+) |
| NG | NG | NG | NG | 3(+) |
| 33.5 | 31.5 | 32 | 32.5 | 7 |
| NG | NG | NG | NG | 19 |
| 25 | R | R | R | 24 |
| <i>H. influenzae</i> | | | | |
| 25 | 22 | 20 | 8 | 5 |
| NG | NG | NG | NG | 8 |
| NG | NG | NG | NG | 9 |
| NG | NG | NG | NG | 15 |
| <i>Klebseilla</i> | | | | |
| _(5) | 25 | 21.5 | 15 | 1 |
| NG | NG | 22 | 19 | 1A |
| NG | NG | NG | 31.5 | 10 |
| 73 | 56 | 21 | 22 | 10A |
| NG | NG | NG | NG | 13 |
| 35 | 30 | 18.5 | 12.5 | 14 |
| 24 | 21 | 18.5 | 12.5 | 14A |
| NG | NG | NG | 30 | 14B |
| - | 39 | 17.5 | 15 | 15 |

| | | | | |
|------------------------|----|----|------|---------------|
| 24.5 | 26 | 19 | 15 | 16 |
| NG | NG | NG | NG | 16A |
| NG | NG | NG | NG | 18 |
| NG | NG | 21 | 17 | 20 |
| <i>Ps. Aeuroginosa</i> | | | | |
| NG | NG | NG | NG | 2 |
| NG | NG | NG | NG | 3 |
| NG | NG | 50 | 13.5 | 4 |
| NG | NG | 39 | R | 9 |
| <i>Proteus</i> | | | | |
| NG | NG | NG | NG | 2 |
| NG | NG | NG | NG | 4 |
| <i>Enterobacter</i> | | | | |
| R | R | R | R | 4 |
| NG | NG | NG | NG | 5 |
| NG | 70 | 64 | 50 | 23 |
| NG | NG | 26 | 23 | 25 |
| <i>E. coli</i> | | | | |
| NG | NG | 70 | 29 | 3 |
| 33 | 30 | 20 | R | 12 |
| NG | NG | NG | 40 | 12A |
| NG | NG | NG | NG | 13 |
| NG | NG | NG | NG | 14 |
| NG | NG | NG | NG | 22 |
| NG | NG | 70 | 50 | 22A |
| NG | NG | NG | NG | 39 |
| <i>M. catarrhalis</i> | | | | مسحة الموزتين |
| NG | NG | NG | NG | 3 |
| <i>Klebsiella</i> | | | | |
| NG | NG | NG | NG | 20 |
| <i>Pseudomonas</i> | | | | غسيل القصبات |

| | | | | |
|----|----|----|----|---|
| NG | NG | NG | NG | 5 |
| NG | NG | NG | NG | 6 |

(١) يشمل القياس قطر الحفرة ٥ ملم

(٢) NG: No growth اي ان العزلة حساسة ولم تستطع النمو

(٣) R: Resist اي ان العزلة مقاومة

(٤) + انظر جدول (١)

(٥) لم يجر الفحص

تشير نتائج جدول (٢) ان اغلب العزلات هي حساسة لثنائي الاستيل اذ باغت نسبة العزلات التي لم تنمو إطلاقاً لكافة التراكيز (حوالي ٥١%) في حين كانت العزلات المقاومة لكافة التراكيز 3.2%. ومن جهة ثانية يلاحظ ان العزلات التي كانت مقاومة لعدد كبير من المضادات مثل العزلة ١٩ من *Staphylococcus* والتي كانت مقاومة لتسعة من المضادات الحيوية كانت حساسة جداً ولم تستطع ان تنمو بوجود ثنائي الاستيل حتى بأقل التراكيز المستعملة او الأقل منها (نتائج غير مسجلة). وكذا الحال مع العزلات المقاومة لسبع مضادات حيوية وهي العزلة رقم 16A من *Klebsiella* والعزلة ٢٥ من البكتريا *Enterobacter*. ومن الملاحظ ان بكتريا *H. influenzae* التي تعد من المسببات الخطرة للقناة التنفسية كانت هي الأخرى حساسة جداً لثنائي الاستيل. وقد أشير الى ان مركب ثنائي الاستيل يتداخل مع استهلاك الأرجنين بتفاعله مع البروتين الذي يرتبط بالأرجنين لنقله الى داخل الخلايا [13,12] وفي هذا المجال فان اغلب البكتريا المسببة سالبة لفحص الأرجنين [14] وهذا قد يفسر مقاومة العزلة رقم ١٠ العائدة للجنس *Streptococcus* جدول (٢) ولكن قد يكون للمركب اكثر من فعالية ولا يمكن التأكيد على هذه الآلية لان عدد العزلات قليل ويتمثل بعزلة واحدة، بالإضافة الى ان هناك عزلات من *Streptococcus* معزولة من إصابات أخرى أظهرت حساسية تجاه المركب (دراسة تحت النشر). ولذلك يمكن ان يؤخذ استعمال ثنائي الاستيل كأحد الاتجاهات في معالجة الإصابات التنفسية حيث تشير الدراسات القديمة وممارسات بعض الشعوب الى استعماله ضد أكثر الإصابات تأثيراً في الجهاز التنفسي عن طريق الاستنشاق [15].

References

1. Fendric, A.M.; Saint, S.; Brook, I.; Jacobs, M.R.; Pelton, S. and Sethi, S. Diagnosis and treatment of upper respiratory tract infections in the primary care setting. *Clinical. Therapy* , Vol , 23, pp 1683-1706 , 2001 .
2. Shimoda, K. "Susceptibilities of bacteria isolated from patients with lower respiratory infections diseases to antibiotics" . *Japanese Journal of Antibiotic* Vol , 54 , pp 331-364 , 2001 .
3. Mlynarczyk, G. *International . Antimicrobial Agents*. Vol , 18 , pp 497-502, 2001 .
4. Wood, B.J.B. and Holzappel, W.H. (Eds). "The genera of lactic acid bacteria " , Blackie Academic and Professional. London , 1995 .
5. Kulshrestha, D.C. and Marth, E.H. "Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk I- *Escherichia coli* " . *Journal of. Milk and Food Technology*. Vol , 37 , pp 510-516 , 1974 .
6. Kulshrestha, D.C. and Marth, E.H. "Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. II- *Salmonella typhimurium*." *Journal of. Milk and Food Technology*. Vol , 37: 539-544 , 1974 .
7. Kulshrestha, D.C. and Marth, E.H. "Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. III- *Staphylococcus auerus*". *Journal of. Milk and Food Technology*. Vol , 37, pp 545-550 ,1974 .
8. Kulshrestha, D.C. and Marth, E.H. "Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. IV- *Streptococcus lactis*" . *Journal of Milk and Food Technology*. Vol , 37 , pp 595-599 ,1974
9. Stoner, G.D.; Shimlin, M.B.; Kniazeff, A.J.; Weisburger, J.H.; Weisburger, E.K. and Gori, G.B. " Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice " . *Cancer Research*. Vol , 33 , pp 3069-3085 , 1973 .
10. Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations". *FEMS Microbiology. Review*. Vol , 87 , pp 149-164 , 1990 .
11. Navarro, V.; Villarreal, M.L.; Rojas, G. and Lozoya, X. "Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexico traditional medicine for the treatment of infections diseases " . *Journal of Ethnopharmacology*. Vol , 53 , pp143-147 , 1996 .
12. Jay, J. "Modern food microbiology". 3rd end. Van Nostrand Reinhold: New York ,1986
13. Vandenberg, P.A. "Lactic acid bacteria; their metabolic products and interference with microbial growth". *FEMS Microbiology. Review* Vol , 12 , pp 221-238 , 1993 .
14. Hardie, J.M. and Whiley, R.A. The genus *Streptococcus*. In "*The Genera of Lactic Acid Bacteria*" eds. B.J.B. Wood and W.H. Holzappel. Blackie Academic and Professional. London. p 55-124, 1995.
15. Jalander, Y.W. "Deacetyl als tuberkelbazilln tötender Bestandteil des finnischen Holzeeres. Naunyn. Schmie-delbergs". *Archive . Experimental . Pathology. Pharmakology* , Vol , 180 , pp 628-630 , 1936 . (cited in Ref. 10)