

تأثير بعض المركبات الكيميائية المصنعة على بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

أنوار صالح صيهود
كلية الطب/ جامعة القادسية

الخلاصة :-

جمعت 155 عينة من الأطفال الرافدين والمراجعين إلى مستشفى الولادة والأطفال والذين يعانون من التهاب الرئة الحاد أو المزمن، درس تأثير بعض المواد الكيميائية المصنعة وهي N-pyridine-4-ythiourea و N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl urea على نمو بكتريا *Klebsiella pneumoniae* والتي عزلت من الحالات أعلاه. شكلت بكتريا *Klebsiella pneumoniae* نسبة 20%، أبدت المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة تأثيراً واضحاً على بكتريا *K. pneumoniae*، وان التأثير تباين حسب التركيز المستخدم. ومن خلال قياس أقطار التثبيط، وجد ام مادة N-pyridine-4-ythiourea وفي التركيز 100 مايكروغرام/مل تثبط نمو البكتريا بقطر تثبيط (23±0.8) ولكن عند استخدام 12.5 مايكروغرام/مل من المركب أعلاه لم تستجب البكتريا. في حين عند استخدام 100 مايكروغرام/مل من N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl urea تثبط نمو البكتريا أعلاه بقطر تثبيط (0.3±26) و (0.3±21)، (0.9±19) و (0.6±14) عند استخدام (50، 25 و 12.5) مايكروغرام/مل على التوالي.

المقدمة :-

تعد بكتريا *Klebsiella ssp.* واحدة من اهم المسببات المرضية لعدة حالات سريرية مثل اخماج الجهاز التنفسي، اخماج الجهاز البولي، بالإضافة الى كونها من البكتريا الانتهازية التي تهاجم مضطربي المناعة في المستشفيات وبذلك تعد عامل مهم في احداث الاخماج المكتسبة في المستشفيات¹. ان هذه البكتريا تعد من المسببات الجرثومية المهمة التي تشترك في إحداث الإنتان الدموي (septicemia) عند الاطفال حديثي الولادة².

تمتاز هذه البكتريا بكونها من البكتريا السالبة لصبغة كرام ، ذات كبسولة غير متحركة ، مخمرة للاكتوز ، هوائية اختيارية، سالبة لاختبار الاوكسيديز ، وتتواجد في البيئة ولها مظيفين، الاول هو المياه والفضلات والتربة والنباتات والمضيف الثاني هو الاسطح المخاطية للانسان وبعض الحيوانات مثل الخنازير وهي تشابه بكتريا *Enterobacter sp.* و *Citrobacter sp.* في هذه الصفة³.

تمتلك جنس *Klebsiella* عدة أنواع منها *K. aerogenes*، *K. granulomatis*، *K. oxytoca*، *K. milletis*، *K.*، *K. pneumoniae planticola*، *K. pneumoniae*، *K. singaporaensis* و *K. varriicola* ويعد النوع *K. pneumoniae* من اهم الانواع المدروسة لما سببته من حالات مرضية متعددة وخاصة اخماج الجهاز التنفسي⁴.

وتمتلك هذه البكتريا عدة عوامل تساعدها في إحداث الإصابة ومنها المحفظة (capsule)، اذ يعد هذا التركيب من التراكيب المهمة في امراضية هذه البكتريا فهو يعمل كطبقة واقية للبكتريا من عملية البلعمة من قبل الخلايا الالتحامية داخل جسم الكائن الحي وبذلك تبطل الوظيفة الدفاعية لخلايا الدم البيضاء من نوع Macrophage⁵. وقد وجد ان إعطاء الحيوانات جرعة عالية من مستضد المحفظة أدى إلى حصول شلل مناعي في هذه الحيوانات⁶. بالإضافة إلى الشعيرات (pili) التي تساعد هذه البكتريا في الالتصاق على الأسطح المخاطية للأنسجة الحيوانية (بذلك فانها تسهل عمل البكتريا في مكان الإصابة، وكذلك فإن طبقة عديد السكريات الدهنية (lipolysaccharide) في جدار هذه البكتريا تعد كسم داخلي (endotoxin) لها تأثيرات مهمة في احداث الإصابة داخل جسم الكائن الحي⁷.

فضلا عن ذلك فإن هذه البكتريا اصبحت في الآونة الأخيرة تمتلك مقاومة عالية للمضادات الحياتية المستخدمة في العلاج نتيجة لسهولة اكتسابها لبلازميدات المقاومة من أجناس بكتيرية أخرى⁸، اذ وجد ان هذه البكتريا تنتج أنزيمات البيبتالاكتاميز الواسعة المدى (extended-spectrum β-lactamase) والتي تبطل عمل كل من مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات⁹. ونتيجة لتطور المقاومة المتعددة في هذه البكتريا ، ولقلة الدراسات التي تتناول هذا الموضوع ارتأينا القيام بهذه الدراسة التي تهدف الى :

1. عزل وتشخيص بكتريا *K. pneumoniae*.
2. دراسة تأثير بعض المواد الكيميائية المصنعة في المختبر وهي كلاً من مادة N-pyridine-4-ythiourea و مادة N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl urea على نمو بكتريا *K. pneumoniae*. مختبرياً، علماً ان هذه المواد لم تحدد طبيعتها لحد الآن كونها سامة أو غير سامة

طرائق العمل

1- المركبات الكيميائية المستخدمة في الدراسة تم الحصول على المركبات الكيميائية من مختبر الكيمياء / كلية الطب / جامعة القادسية، إذ تم تحضير هذه المواد كالاتي:-
1- مادة N-pyridine-4-ylthiourea تم تحضير هذه المادة بإذابة 1.67 غم من مادة N-pyridine-4-ylamine مع 5.76 غم من ثايوريا Thiourea في 10 مل من الكحول المطلق ثم اضيف للمزيج قطرتين من حامض الهيدروكلوريك المركز بعدها وضع المزيج في حمام ثلجي لترسيب مكونات التفاعل بعدها رشح الخليط ثم اذيب في الايثانول المطلق ثم اضيف اليه الماء المقطر لتحويل المادة المترسبة إلى بلورات نقية¹⁰

2- مادة N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl urea تم تحضير هذه المادة بإذابة 2.2 غم من مادة 2-amino-5phenyl-1,3,4-Thiaadiazole و 0.6 غم من اليوريا في 10 مل من الكحول الايثانول المطلق، ثم اضيف للخليط قطرتين من حامض الهيدروكلوريك المركز ترك المزيج لمدة 5 ساعات ثم وضع في حمام ثلجي لترسيب ناتج التفاعل ثم رشح المزيج واضيف للناتج 2مل من الايثانول المطلق ثم اضيف للمزيج كمية من الماء المقطر لتحويل المادة الذائبة إلى بلورات نقية¹⁰.

2- عزل البكتريا وتشخيصها

جمعت 155 عينة من الاطفال الراقدين والمراجعين الى مستشفى الولادة والاطفال والذين يعانون من التهاب الرئة الحاد او المزم من حسب تشخيص الطبيب المختص، اذ جمع قشع الطفل المصاب في قناني زجاجية سعة (50 مل) ونقل الى مختبر المستشفى مباشرة لغرض زراعة العينات تشخيصها، اذ تم زرع العينات على اوساط اكار الدم و اكار الماكونكي ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة¹¹
تم تشخيص البكتريا بالاعتماد على الصفات الشكلية للمستعمرة على الاوساط اعلاه وطريقة تفاعلها مع صبغة كرام وشكل البكتريا وطريقة تجمعها، كما اجري عدد من الفحوصات الكيموحيوية على البكتريا ومنها فحص الاندول، احمر المثيل- فوكس برسكاور تحلل حامضي اللايسين والاورنثين تخمر اللاكتوز في درجة 44م، وتخمر سكري D-melezidose ، L-sorbose ، بالاعتماد على الاختبارات التي أوردها^{12, 13} والتي تميز بكتريا *K. pneumoniae* عن بقية الاجناس البكتيرية .

3- فحص حساسية البكتريا لمادتي

N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-ylurea و N-pyridine-4-ylthiourea:
درس تأثير المواد الكيميائية أعلاه بطريقة الانتشار بالأقراص، إذ زرعت البكتريا على وسط المرق المغذي Nutrient broth وحضنت بدرجة 37م لمدة 24 ساعة¹¹. حضرت تراكيز مختلفة من المادتين أعلاه وهي (2.5، 25، 50، 100) مايكروغرام/مل اخذ (1) مل من كل تركيز من هذه التراكيز واضيف الى انابيب يحتوي كل منها على 100 قرص من ورق الترشيح (Wattman No.1) وبقطر 6 ملم والمعمم بجهاز الموصدة. ثم لقع عدد من الاطباق الحاوية على وسط Muller-Hinton Agar (0.1) مل من العالق البكتيري وبتركيز 10^8 ونشر على وسط المولر هنتون بعدها وضعت (4) اقراص في طبق بحيث كل قرص يحوي تركيز من التراكيز اعلاه وبثلاث مكررات لكل عزلة بكتيرية . وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة 37م لمدة 24 ساعة واستدل على النتيجة بقياس قطر منطقة التثبيط المحيطة بالقرص¹¹.

النتائج والمناقشة :

العزل والتشخيص

شكلت بكتريا *K. pneumoniae* نسبة (20%) من البكتريا المعزولة من حالات التهاب الرئة لدى الاطفال، اذ ظهرت هذه البكتريا على وسط الماكونكي مخمرة لسكر اللاكتوز، مخاطية دائرية-محدبة الشكل وفي الفحص المجهرى ظهرت على شكل سلاسل تتكون كل سلسلة من 2-3 خلايا، سالبة لصبغة كرام.
اما في الاختبارات الكيموحيوية فأعطت هذه البكتريا نتيجة سالبة لفحص الاندول و احمر المثيل وموجبة لاختبار فوكس برسكاور ومحللة للاينين وتفقد هذه القابلية عند تنميتها في وسط حاوي على حامض Ornithine ومتغايرة في قابليتها على النمو في درجة حرارة 44م وانتاج غاز من تخمر اللاكتوز وهي غير مخمرة لسكر D-melezitose ولكنها تخمر L-sorbose، الجدول (1)، وجاءت نتائج هذه الاختبارات مطابقة لما ذكره^{12, 13}.
لجأت بعض الجهات البحثية الى البحث عن استخدام مواد بديلة ومنها النباتات الطبية والمواد الكيميائية المصنعة وغير السامة. فيما يخص اختبار حساسيتها لبعض المركبات الكيميائية. أبدت المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة تأثيرا واضحا على بكتريا *K. pneumoniae* وان هذا التأثير تباين حسب نوع التركيز المستخدم، اذ بلغ قطر التثبيط نمو البكتريا اعلاه (0.8±23) عند استخدام 100 مايكروغرام/مل من المركب رقم (1) وبلغ قطر التثبيط 0.7±20 عند استخدام 50 مايكروغرام/مل و

0.8±16 عند استخدام 25 مايكروغرام/مل في حين لم تستجيب البكتريا للتركيز 12.5 مايكروغرام/مل من المادة اعلاه اما عند استخدام المركب رقم (2) وبنفس التراكيز اعلاه فقد ثبتت نمو البكتريا اعلاه وبلغت اقطار التثبيط 0.3±26، 0.3±21، 0.9±19 و 0.6±14 في التراكيز 100 مايكروغرام/مل ، 50 مايكروغرام/مل ، 25 مايكروغرام/مل و 12.5 مايكروغرام/مل على التوالي.

وبذلك يتضح ان هذا المركب كان أكثر تأثيرا من المركب الأول على نمو البكتريا جدول (2) تتفق نتائج دراستنا من حيث تأثير المادتين على البكتريا مع ما توصل إليه¹⁰. الذي أشار الى ان المركبين رقم (1، 2) لهما تأثير مثبط واضح على بكتريا *Proteus* sp. وان المركب الثاني كان أكثر تأثيرا من المركب الأول. غير ان هذين المركبين لم تدرس طبيعتهما بعد في كونهما مركبين سامين ام لا، لتحديد فيما كان بالإمكان استخدامهما كمركبات علاجية أو يتحدد استخدامهما لتعقيم الاسطح لكونهما اعطى نتائج جيدة في تثبيط نمو البكتريا المستخدمة هذا البحث.

وقد يعدو سبب تأثير المادتين اعلاه على البكتريا نتيجة لتداخلهما مع بناء الجدار الخلوي خلال عملية تضاعف البكتريا مما يمنع نمو البكتريا او تكاثرها او نتيجة لارتباط المواد اعلاه كيميائيا مع الاحماض الامينية التي تدخل في تصنيع البروتين الضروري لحياة البكتريا ونموها¹⁴.

جدول رقم (1) الاختبارات التشخيصية لبكتريا *K. pneumoniae*

النتيجة	الاختبارات الكيموحيوية
-	فحص الاندول
+	فوكس برسكاور
-	احمر المثل
+	تحلل حامض اللايسين
-	تحلل حامض الاورثيين
-	انتاج غاز CO2 من تخمر اللاكتوز في درجة حرارة 44م
+	تخمير سكر D-Melezitose
+	تخمير سكر L-sorbose

جدول رقم (2) حساسية بكتريا *K. pneumoniae* لبعض المركبات الكيميائية

مركب رقم (1)				العزلات البكتيرية
%12.5	%25	%50	%100	
0.5±8	0.8±16	0.7±20	0.8±23	<i>K. pneumoniae</i>
مركب رقم (2)				
%12.5	%25	%50	%100	
0.6±14	0.9±19	0.3±21	0.3±26	

المصادر

- 1- Podschun, R. and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and pathogenicity factors, clinical microbiology reviews, p: 589-603 .
- 2- Bennett, J.M.; Old field, R.; Ghosh, K. (1995). Septicemia as a hospital hazard. J. Hosp. Infect. 6 : 406-412 .
- 3- Schaberg, L.; Cooke, E.M.; Pons, R. (1991). Taxonomic and nomenclature changes in Enterobacteriaceae. Hew publication (CDC) 79-8356. Centers for Disease control, Atlanta , Ga.
- 4- Carpenter, J.L. (1990) *Klebsiella* pulmonary infections; Occurrence at one medical center and review . Rev . Infect . Dis . 23:179- 181 .
- 5- Highsmith, A.K (2002). *Klebsiella pneumoniae* : selected virulence factors that contribute to pathogenicity-infect. Control. 6: 75-77 .
- 6- Ehrenwort, L. (2004). The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice. J. Bacteriol . 72:713 – 717 .
- 7- Cryz, S.J.; Furer, E.; Germanier, G. (2000). Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis infect. Immun . 43: 440-441 .
- 8- Gouby, A.G. (1994). Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital . J. Clin. Microbial . 32:301-305 .
- 9- Katsanis, G.P. (2005). Detection of *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli strains producing extended -spectrum β- lactamase J. Clin . microbial . 32:691-696.
- 10- Al-shammery, K.M. (2008). Effect of some synthesized urea, thiourea and Schiff bases Derivatives against *Proteus* ssp. From urinary tract infection. PhD. Thesis. Al-Nahhrain university.
- 11- Collee, G.J.; Fraser, G.A.; Marmion, P.B. and Simmon, A.(1996). Practical Medical Microbiology. 14th ed., Churcill Livinstone, Edinburg, pp: 163-174.
- 12 Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J. and Shadany, H.S.(1985). Manual of Cincial Microbiology . Washington D.C., U.S.A.
- 13- MacFaddin, J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. the Williams & Wilkins Co., London.
- 14- Zhao, F. and Enzenauer R.W. (2004).Conjunctivitis, neonatal. E-medicine website: <http://www.emedicine.com/oph/topic325.htm>. Accessed 12 Aug 2004

**Effect of some synthetic chemical compounds on
*Klebsiella pneumoniae***

**Anwar saleh sayhood
College of medicine / Al-qadisiya university**

Abstract:

One hundred and fifty five isolates were collected from maternity and children hospital who suffer from acute and chronic pneumonia. The effect of some synthesized chemical compounds such as N-pyridine-4-ythiourea and N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl) urea was studied, on growth of *K. pneumoniae* which isolated from case above. Twenty percentage gave positive results for *K. pneumoniae* growth. The synthesized compounds appeared effect on growth of bacteria about and the effect was varied according to concentration used, by measuring of zone inhibition, N-pyridine-4-ythiourea in 100µg/ml were inhibited growth of *K. pneumoniae* in zone inhibition diameter (23±0.8) but when use 12.5µg/ml from about compound *K. pneumoniae* did not response, So when used 100µg/ml from N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazole)-2-yl) urea were inhibited growth of above bacteria by zone inhibition diameter (26±0.3) and 21±0.3, 19±0.9, 14±0.6 when used (50, 25 and 12.5) µg/ml respectively.