فعالية ثنائي الاستيل تجاه عزلات بكتريا الإصابات السطحية[+]

DIACETYL ACTIVITY TOWARD SUPERFICIAL INFECTION ISOLATES

زهرة محمود الخفاجي* خالدة كريم الكريمي**

المستخلص

تم الحصول على ٧٩ عزلة من اصابات سطحية بالجسم من مختبرات مدينة صدام الطبية ، مستشفى طوارىء الكرخ للفترة من اذار /٢٠٠٢ الى نهاية كانون الثاني لعام ٢٠٠٣.

شملت النماذج مسحات للجروح والحروق ومسحات جلدية ومسحات مهبل ومسحات للاذن . شكلت البكتريا السالبة لصبغة كرام النسبة الاكبر ٨٢،٣% والتي كان ٥٧% منها بكتريا **Pseudomonas** تلتها بكتريا *Escherichia coli* ٢٦ % . اغلب العزلات كانت مقاومة لمضاد حيوي واحد او اكثر والبعض منها كان مقاوما لثمانية أو تسعة او عشر مضادات حيوية .

اثر مركب ثنائي الاستيل على اغلب العزلات باستعمال طريقة الانتشار في الاكار عند استعمال التراكيز ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مايكروغرام /حفرة ، البعض من العزلات كانت حساسة جدا إذ لم يظهر اي نمو بأقل التراكيز المستعملة . تم اقتراح استعمال مركب ثنائي الاستيل في علاج الإصابات السطحية بعد تحضيره بشكل ملائم اذ انه من المركبات الطيارة.

Abstract

Seventy nine isolates of superficial infections were obtained from Medical City and Al-Karch Emergency Hospital from March / 2002 to January / 2003 .

Samples included burn swabs, wound swab, pus skin swabs, vaginal swabs and ear swabs. Gram-negative bacteria represented the highest ratio 82%. *Pseudomonas* compromised the highest percentage 57% , followed by *Escherichia coli* 26% . Most of the isolates were resistant to one or more antibiotics , some were resistant to eight , nine or ten antibiotics.

Diacetyl affected most of the isolates using agar diffusion method when different concentrations were used (30, 60, 120, 180 µg / well). Some isolates were very sensitive and could not grow at all, the use of diacetyl to treat superficial infections was suggested after proper formulation since the compound is volatile.

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٤/٤/٢١ تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٨/٢٨

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية/ للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق

** قسم الأحياء المجهرية / كلية الطب/ جامعة بغداد / العراق

المقدمـــة

تكون الاصابات الخارجية بالبكتريا بشكل خاص مصدرا لنقل المقاومة للمضادات الحيوية وتطويرها، لذلك كانت الاصابة في المستشفيات باحياء اغلبها اكتسب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية والتـــي قـــد يصل الى عشرين مضاد حيوي وبضمنها المطهرات والمعقمات وغيرها [١]. وتزداد المشكلة وطأة عند تلوث الجروح والحروق بدرجة رئيسة بعزلات المستشفيات [2]، بالإضافة الى ان البكتريا تـــشكل اهـــم مـــسببات إصابة المهبل لدى العديد من النساء [3] واصابات الاذن وغيرها من الاصابات الخارجية والتي اصبح العديد منها مقاوماً للمضادات الحيوية المستعملة [١] . وتختلف البكتريا في مثل هـــذه الاصـــابات الخارجيـــة فـــي استجابتها للمضادات التي تعطى عن طريق الفم او الادوية ذات الاستعمال الخارجي مثـــل المـــراهم، وعلـــى العموم فان سوء الاستعمال وكثرته ادت الى ظهور المقاومة [5,4].

ومن جهة اخرى يلاحظ ان لمركب ثنائي الاستيل (Diacetyl) فعلية تثبيطية جيدة تجاه العديد مـــن الاحياء المجهرية وعلى وجه الخصوص البكتريا [٦، ٧، ٨، ٩]،وثنائي الاستيل احد مركبات النكهـــة للزبـــد المنضج [١٠].

اجريت هذه الدراسة قي محاولة لايجاد مادة ذات مدى واسع من التأثير او الفعالية لاســـتعمالها ضـــد الاصابات السطحية التي اصبحت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات قيد الاستعمال .

المواد وطرق العمل

مركب ثنائي الاستيل Diacetyl : مزود من قبل شركة Fluka.

العزلات البكترية : تم الحصول عليها من الحالات الواردة الى مختبرات مدينة الطب للمدة الواقعة بـــين اذار /٢٠٠٢ الى كانون الثاني / ٢٠٠٣ .

تم اعتماد تشخيص العزلات وتحديد حساسيتها للمضادات الحيوية Antibiogramعلى نتائج مختبـــرات المستشفيات المذكورة . والمضادات المستعملة فهي كما يأتي :

Ac; Augmentin, 30 µg. An; Amikacin , 30 µg. Am; Ampcillin , 10 µg. Axm; Amoxacillin , 10 µg. C; Chloramphecol , 30 µg. Ca; Ceftazidine , 30 µg. Ce; Cephatoxin , 30 µg. Cf; Ciprofloxacin , 5 µg. Cro; Ceftriaxone , 30 µg. Cx; Cloxacillin , 5 µg. E; Erythromycin, 5 µg. Te; Tetracyclin , 10 µg. Tm; Tobramycin , 10 µg . Ra; Rifmpicin , 5 µg. Co; Co-trimoxzole , 25 µg. Gm; Gentamycin, 10 µg.

دراسة التأثير التثبيطي لمركب ثنائي الاستيل : تم باستعمال طريقة الحفر Well assay [١١] ، واستعمال وسط Hinton– Muller في اطباق بتري بقطر ٩ سم وارتفاع الوسط فيه ٤ ملم ، عملت حفربقطر ٥ ملم . زرعت الاطباق بمزروع ليلي منمى في وســـط المرق المغذي (Nutrient broth) وخفف الى ١:١٠٠ في محلول الملح الفسلجي ثم استعمل ٢، مللتر لنشره على سطح الوسط الغذائي ، ثم عملت الحفر واضيف اليهـــا ٥٠ مايكرولتر من تراكيز مركب ثنائي الاستيل التي حددت مـــسبقا (٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مـــايكروغرام/ حفرة) بعد تخفيفه في الماء المقطر الدافيء (درجة حرارة ٣٠ –٣٥ ْم). تركت الاطباق لمدة ساعة بدرجة حرارة الثلاجة (٤ ْم) ثم حضنت لليوم الثاني بدرجة حرارة ٣٧ ْم مع استعمال الماء المقطر المعقم كـــسيطرة ضابطة .

قرأت النتائج بقياس اقطار تثبيط النمو و إذ ما كانت العزلات حساسة جدا فيستعمل تركيزاً واحداً في الطبق بدلا من اربعة حفر . اعيدت التجربة مرتين وبمكررين لكل تجربة .

النتائـــــج والمناقشـــــــة

تم الحصول على ٧٩ عزلة بكترية من اصابات سطحية مختلفة. ويوضح الجدول (١) مصادر العزلات وارقامها والمضادات الحيوية المقاومة لها .

جدول ١ : العزلات المستعملة في الدراسة والضادات الحيوية المقاوم لها

مصدر العزلة	رقم العزلة وتشخيصها	المضادات الحيوية
مسحات الحروق		
	Pseudomonas	
	1	**Ca,Cro,Cfm,Tm,Gm,Cf**
	2	**Cro,Cfm,Am,Tm,Gm,Cf**
	3	**An**
	4	**Tm,Gm,Cf,ce**
	5	**An,Gm,Ce**
	6	**Ca,Ac,Co,Am,Tm,Gm,Cf,Ce**
	9	**Ca,Te,Cro,An,Tm,Gm,Cf,Ce**
	10	**Ca,Cro,An,Ac,Cfm,Am,Tm,Gm,Cf,Ce**
	11	**An,Ac,Tm,Gm,Cf,Ce**
	12	**Am,Ac,Gm,Ce**
	E. coli	
	1	**Gm,Ca,Cfm,Cf,Am,Tm**
	2	**Ca,Te,Am,Tm**
	3	**Co,Te,Cro,Cfm,Gm,Ce**
	4	**TE,Axm,Gm,Cf,Cfm**

An,Ac,Gm	5	
Ca,An,Cf	6	
Ca,An,Gm,Cf	8	
Klebsiella		
Ca,Te,Cro,Ac,Cfm,Gm,Cf,Ce	7	
Ca,An,Ac,Cfm,Gm	9	
Ra,Axm,Ac,Cro,Co,Am,Tm,Gm,Cf,Ce	13	
مسحات حروق **Staphyloccocus**		
Ac,Co,Tm	4(+)[1]	
E,Cfm,Ca,Co,Gm,Ce,Cf,An	5(+)	
E,Ca,Cx,Am,Tm,Gm,Ce,Cf	7(alb)[2]	
Gm	8(alb)	
مسحات جروح **Pseudomonas**		
-	1	
Ac,Gm,An,Ce	1A	
Am,Ac,Ca,An,Cf,	9	
Am	12	
E.coli		
Cro,Ac,Cfm,Ca,Gm,Cf	3	
Ac,Cfm,Gm,Ce,Cf	4	
Ac,Cfm	7	
-	20	
Ce	21	
Co	27	

Klebsiella		
Gm,Tm,Axm,C	**2**	
Staphyloccocus		
Ce,Ac	**1(+)**	
-	**1A**	
Co	**2**	
Ac,Cfm,Cf	**5(+)**	
-	**21**	
مسحات جروح **Proteus**		
Axm	**1**	
Ac,Gm,An	**2**	
Cf	**3**	
Am,Ac,Ca,Ce,Cf	**8**	
Enterobacter		
Am,Cro,Gm,Ce,Cf,An	**6**	
قيح الجروح **Pus** **E.coli**		
Gm,Axm	**34**	
-	**44**	
Staphylococcus		
-	**2(+)**	
Ac,Co,Gm,Ce,Cf,An	**3(+)**	
-	**6(+)**	
مسحات الجلد **E. coli**		
Ra,Co	**12**	
مسحات مهبل **Pseudomonas**		

Ce,Gm,Tm	7	
Staphylococcus		
Gm,Am,Ca,Ce,Cf	5(+)	
مسحات الاذن Pseudomonas		
Gm	1	
An,Ce,Ca,Gm,Cf	1A	
C,Gm,An,Ce	2	
Am,Tm,Gm,Ce	3	
Ac	4	
Gm,An	5	
Ac,Gm,Cf	6	
Ac	6A	
Gm,Cf,Ce	7	
-	7A	
Cf	8	
Am,Tm,Cfm,Gm,Ce,Cf	8A	
Am,Co,Tm,Cfm,Ca,Ce	9	
Am,Co,Cfm,Ce	10	
Am,Co,Cfm,Ce	11	
Am,Co,An	12	
Am,Co,Tm,Cfm,Gm,Ce,Cf	13	
Tm,Ac,Ca,Ce,Cf	14	
E.coli		
Ce,Co,An	24	
Klebsiella		

Co,Gm,Ra,Am	**4**	
Co,Axm,C	**6**	
Co,Gm,Tm,Axm,Am,C	**9**	
Na,Tm,Cf	**9A**	
Gm,Tm	**11**	
Proteus		
-	**16**	
Strep, faecalis		
Tm	**9**	

(١) + العزلة موجبة لفحص Coagulase

(٢) alb العزلة *Staphylococcus albus*

(٣) – لم يجري الفحص نظرا لعدم توفر المضادات الحيوية حين ورود النموذج.

ويتضح من الجدول اعلاه ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تشكل النسبة الكبيرة ٣و٨٢% وكانت الاغلبية هي بكتريا Pseudomonas ٥٧% تلتها بكتريا E. coli ٢٦% ، وتشير النتائج الى ان اغلب البكتريا مقاومة لواحد او اكثر من المضادات الحيوية رغم ان الصورة ليست حقيقية نظرا لعدم توفر اقراص المضادات الحيوية عند ورود النماذج،ولكن يمكن استنتاج ان البكتريا المقاومة لثلاثة من المضادات تصل نسبتها الى حوالي ٥و١٦ % والمقاومة لاربعة مضادات ١٤% والمقاومة لثمانية مضادات ٣و٦ % اما المقاومة لعشر مضادات فهي بحدود حوالي ٥و٢% وبهذا يتضح مدى خطر انتشار هذه العزلات المقاومة في الأصابات الخارجية التي تكون اكثر المصادر لنشر المقاومة بين البكتريا [١] ، بالاضافة الى امكانية انسحابها لتلوث المطهرات والمعقمات [١٢] .

اما تأثير مركب ثنائي الاستيل على العزلات المستعملة في الدراسة فموضح في الجدول ٢ .

جدول ٢ : تأثير تراكيز مختلفة من مركب ثنائي الاستيل على العزلات المستعملة في الدراسة

مصدر العزلة ورقمها	معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)			
	٣٠ مايكروغرام	٦٠ مايكروغرام	١٢٠ مايكروغرام	١٨٠ مايكروغرام
مسحة الحروق	**Pseudomonas**			
١	**31**	**35**	-(١)	**-**
2	**NG(2)**	**NG**	**NG**	**NG**

48	**45**	**21**	**19.5**	**3**
NG	**NG**	**NG**	**27**	**4**
40	**35**	**R**	**R(3)**	**5**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**6**
NG	**NG**	**27.5**	**21.5**	**9**
62	**51**	**49.5**	**40**	**10**
56	**59**	**47**	**35**	**11**
NG	**NG**	**46**	**39**	**12**
E.coli				
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**1**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**2**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**3**
NG	**31**	**23.5**	**15**	**4**
NG	**37**	**26**	**14**	**5**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**6**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**8**
Klebsiella				
NG	**NG**	**NG**	**58**	**7**
NG	**NG**	**NG**	**14**	**9**
56	**55**	**46**	**35**	**13**
Staphylococcus				
30	**30**	**31**	**19.5**	**4(+) [4]**
62	**49**	**16**	**17**	**5(+)**
19.5	**16.5**	**12.5**	**9**	**7(alb)**

-	14	15	12	8(alb)
Pseudomonas				مسحات الجروح
42	30	18	10	1
NG	NG	34	14	1A
NG	NG	42.5	30	2
NG	NG	45	44	9
E. coli				
NG	NG	44	39.5	3
NG	NG	44	18	4
NG	NG	53	37.5	7
NG	NG	NG	NG	20
NG	NG	NG	NG	21
NG	NG	NG	36	37
Klebsiella				
32	29.5	21.5	13.5	2
Staphylococcus				
29	31	15.5	15.5	1(+)
R	R	R	R	1A
50	44	22	15	5(+)
R	R	R	R	2
NG	NG	NG	NG	21
Proteus				
NG	NG	NG	NG	1
-	30	25	8.5	2
NG	NG	NG	NG	3
41	39	21	16	8
E.coi				قيـــح
NG	NG	NG	NG	34

NG	**NG**	**NG**	**NG**	**44**
Staphylococcus				
-	**22**	**14.5**	**R**	**2(+)**
34.5	**25.5**	**21.5**	**13**	**3(+)**
26	**19.5**	**R**	**R**	**6(+)**
E. coli				**مسحات جلد**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**12**
Pseudomonas				**مسحات المهبل**
R	**R**	**R**	**R**	**7**
Staphylococcus				
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**5(+)**
Pseudomonas				**مسحات اذن**
R	**R**	**R**	**R**	**1**
68	**64**	**60**	**55**	**1A**
NG	**52**	**40**	**21**	**2**
NG	**NG**	**51**	**48**	**3**
41	**35**	**16**	**11**	**4**
58	**55**	**14**	**12**	**5**
R	**R**	**R**	**R**	**6**
-	**30**	**25**	**9**	**6A**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**7**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**7A**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**8**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**8A**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**9**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**10**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**11**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**12**
30	**30**	**18**	**R**	**13**
70	**60**	**28**	**R**	**14**
E.coli				
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**24**
Klebsiella				
-	**28**	**13.5**	**8.5**	**4**
-	**35**	**21.5**	**19.5**	**6**

33	**24.5**	**15.5**	**14.5**	**9**
R	**R**	**R**	**R**	**9A**
R	**R**	**R**	**R**	**11**
Proteus				
39	**37**	**15.5**	**9.5**	**16**
Strep. faecalis				
15	١٦	**15.5**	**R**	**9**

(١) – لم يجر الفحص

(٢) NG: No growth اي ان العزلة حساسة جدا

(٣) R: Resistant اي ان العزلة مقاومة

ويتضح من النتائج ان اغلب السلالات هي حساسة لمركب ثنائي الاستيل وان البكتريا الموجبة اظهرت مقاومة بنسبة ٣و٦% لاقل تركيز ، اما نسبة البكتريا الموجبة المقاومة لكافة التراكيز فيصل الى ٥و٢% اذ ان البعض منها يثبط بارتفاع التركيز وهذا يتفق مع دراسات اخرى [١٣].ومما تجدر الاشارة اليه ان الانواع البكترية التي اظهرت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية كانت حساسة او حساسة جدا إذ لم تستطع النمو بوجود ثنائي الاستيل فمثلا العزلات Pseudomonas (رقم ١٥) وعزلة Klebsiella (رقم ١٣) المقاومة لعشر من المضادات الحيوية كانت حساسة لوجود ثنائي الاستيل . وكذا الحال بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل العزلة Staphylococcusرقم ٥ المقاومة لثمانية من المضادات .

اما عزلات الاصابات الاخرى (غير الجروح والحروق) مثل عزلة Klebsiella عزلة رقم ٩ المقاومة لستة من المضادات الحيوية فقد اظهرت حساسية كبيرة تجاه ثنائي الاستيل . اما عزلات القيح التي شكلت البكتريا العنقودية الموجبة لفحص Coagulase نسبة ٦٠% فقد كانت ذات استجابة موجبة تجاه مركب ثنائي الاستيل على الاقل بالتراكيز العالية نوعا ما . وكانت العزلة رقم ٣ والمقاومة لستة من المضادات فقد كانت اكثر العزلات حساسية .

والنتائج تشير الى ان عزلات المستشفيات تكون اغلبها مقاومة للمضادات الحيوية [١٤] وان تأثير ثنائي الاستيل هو واسع المدى الذي يشابه مضادات الانتان (Antiseptics) اي ان تأثيره يكون اوسع من تأثير المضادات الحيوية [١٤] ، كما ان Biocides التي يمكن ان ينتمي اليها مركب ثنائي الاستيل قد يكون لها اكثر من هدف مقارنة بالمضادات التي لها اهداف محددة داخل او خارج الخلايا وبذلك فأن التداخل مع سطوح الخلايا ومكوناتها يكون مؤثرا بشكل كبير في تحديد حيوية الخلايا [١٥، ١٦] . ومن جهة ثانية يمكن زيادة كفاءة مركب ثنائي الاستيل بخفض الاس الهيدروجيني [١٣] ومثل هذه الستراتيجية يمكن ان تفيد في التأثير على العزلات المقاومة مثل العزلة رقم ٧ من بكتريا Pseudomonas المعزولة من مسحة المهبل ، اذ ان التأثير المسجل كان في الاس الهيدروجيني لوسط Hinton –Muller الذي يتراوح اسه الهيدروجيني ٤و٧ ± ٢و٠ ، كما ان الكفاءة للمركب يمكن ان تزاد باستعمال طريقة ملائمة للتشكيل (Formulation) واستعمال مضافات اخرى [١٤] وعليه فأنه يمكن ان يستعمل كغسول او بشكل مستحضر رذاذي او اي امكانيات اخرى مثل المراهم وغيرها [١٧، ١٨] .

وبذلك يمكن لمركب ثنائي الاستيل ان يكون من الوسائل المهمة لمعالجة البكتريا السالبة لصبغة كرام على وجه الخصوص التي تشكل فيها الطبقات الخارجية عائقا كبيرا تمنع دخول المثبطات الى الخلايـــا [١٩، ٢٠] ، كما انه يمكن ان يخلط مع المضادات الاخرى لتسهل مهمتها [٢١] .

References

1- Lyon,B.R. and Skyrroy, R. 1987. *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus : Genetic basis* . Microbiol. Rev. 51: 88-134.

2- Chai, J., Sheng , Z., Yang , H., Diao, L. and Li, L. 2000 . *Successful treatment of invasive burn wound infection wwwith sepsis in patients with major burns* . Clin. Med.J. 113: 1142-1146.

3- Sobel, J.D. 1990. *Bacterial vaginosis* . Br.J.Clin.Parct.Symp.Suppl. 71: 65-69.

4- Wyatt,T.D., Ferguson,W.P., Wilson,T.S. and McCormick,E. 1977. *Gentamicin resistant Staphylococcus aureus associated with the use of topical gentamicin* .J. Antimicrob. Chemother. 3: 213-217.

5- Nobel,W.C. and Naidoo,J. 1978. *Evolution of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus : the role of the skin* . Br.J.Dermatol. 98: 481-489.

6- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . I- Escherichia coli . J.Milk Food Technol. 37: 510-516.

7- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . II- Salmonella typhimurium . J.Milk Food Technol. 37: 539- 544.

8- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . III- Staphylococcus aureus . J.Milk Food Technol. 37:545-550.

9- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . IV- Streptococcus lactis . J.Milk Food Technol. 37:593-599.

10- Vandenbergh,P.A.1993. *Lactic acid bacteria , their metabolic products and interference with microbial growth* . FEMS Microbiol. Rev. 12: 221-238.

11- Barry,A.L. 1986 .*Procedure for testing antimicrobial agents in agar media : Theoretical considerations* .In " Antibiotics in Laboratory Medicine " Ed. V.Lorian . Willams & Wilkins : Baltimore & London. P 1-26.

12- Arjunwadkar,V.P., Bal,A.M., Joshi,S.A.,Kagal,A.S. , and Bharadwal,R.S. 2001 . *Contaminated antiseptics, an unnecessary hospital hazard*. Ind. J. Med. Sci. 55: 393-398.

13- Jay.J.M. 1982. *Antimicrobial properties of diacety*l . Appl. Environ. Microbiol. 44: 525- 532.

14- McDonnell,G. and Russell, D. 1999. *Antiseptics and disinfectants* : Activity , Action, and Resistance. Clin .Microbiol.Rev. 12: 147-179.

15- Power, E.G.M. 1995. *Aldehydes as biocides. Prog.Med*. Chem. 34: 149- 201.

16- Russell,A.D. 1994. *Glutaraldehyde: Current status and uses* . Infect.Cpntrol. Hosp.Epidemiol. 15: 724-733.

17- Cleeland,R.and Grunberg, E. 1986. *Laboratory evaluation of new antibiotics in vitro and experimental animal infections* . In"Antibiotics in Laboratory Medicine . Ed. V. Lorian . Willams & Wilkins : Baltimore & London . p 825-876.

18- Steve, L., Goodhart, P. and Alekander,J. 1979. *Hydrotherapy burn treatment : Use of chloramines-T"against resistant microorganisms*".Arch.Phys. Med. Rehabil.60:301-303.
19- Ayres, H., Furr,J.R. and Russell, A.D. 1993. *A rapid method of evaluating permeabilizing* . Lett. Appl. Microbiol. 17: 149-151.
20- Hancock, R.E.W. 1984. *Alterations in membrane permeability* . Annu.Rev. Microbiol. 38: 237-264.
21- Scher, K.S. and Peoples, J.B. 1991. *Combined use of topical and systemic antibiotics* .Am.J.Surg. 161: 422-425.

فعالية ثنائي الاستيل تجاه عزلات بكتريا الإصابات السطحية[+]

DIACETYL ACTIVITY TOWARD SUPERFICIAL INFECTION ISOLATES

زهرة محمود الخفاجي* **خالدة كريم الكريمي****

المستخلص

تم الحصول على ٧٩ عزلة من اصابات سطحية بالجسم من مختبرات مدينة صدام الطبية ، مستشفى طوارىء الكرخ للفترة من اذار /٢٠٠٢ الى نهاية كانون الثاني لعام ٢٠٠٣.

شملت النماذج مسحات للجروح والحروق ومسحات جلدية ومسحات مهبل ومسحات للاذن . شكلت البكتريا السالبة لصبغة كرام النسبة الاكبر ٨٢،٣% والتي كان ٥٧% منها بكتريا Pseudomonas تلتها بكتريا *Escherichia coli* ٢٦ % . اغلب العزلات كانت مقاومة لمضاد حيوي واحد او اكثر والبعض منها كان مقاوما لثمانية أو تسعة او عشر مضادات حيوية .

اثر مركب ثنائي الاستيل على اغلب العزلات باستعمال طريقة الانتشار في الاكار عند استعمال التراكيز ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مايكروغرام /حفرة ، البعض من العزلات كانت حساسة جدا إذ لم يظهر

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٤/٤/٢١ تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٨/٢٨

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية/ للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق
** قسم الأحياء المجهرية / كلية الطب/ جامعة بغداد / العراق

اي نمو بأقل التراكيز المستعملة . تم اقتراح استعمال مركب ثنائي الاستيل في علاج الإصابات السطحية بعد تحضيره بشكل ملائم اذ انه من المركبات الطيارة.

Abstract

Seventy nine isolates of superficial infections were obtained from Medical City and Al-Karch Emergency Hospital from March / 2002 to January / 2003 .

Samples included burn swabs, wound swab, pus skin swabs, vaginal swabs and ear swabs. Gram-negative bacteria represented the highest ratio 82%. *Pseudomonas* compromised the highest percentage 57% , followed by *Escherichia coli* 26% . Most of the isolates were resistant to one or more antibiotics , some were resistant to eight , nine or ten antibiotics.

Diacetyl affected most of the isolates using agar diffusion method when different concentrations were used (30, 60, 120, 180 µg / well). Some isolates were very sensitive and could not grow at all, the use of diacetyl to treat superficial infections was suggested after proper formulation since the compound is volatile.

المقدمـــة

تكون الاصابات الخارجية بالبكتريا بشكل خاص مصدرا لنقل المقاومة للمضادات الحيوية وتطويرها، لذلك كانت الاصابة في المستشفيات باحياء اغلبها اكتسب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية والتـــي قـــد يصل الى عشرين مضاد حيوي وبضمنها المطهرات والمعقمات وغيرها [١]. وتزداد المشكلة وطأة عند تلوث الجروح والحروق بدرجة رئيسة بعزلات المستشفيات [2]، بالإضافة الى ان البكتريا تـــشكل اهـــم مـــسببات إصابة المهبل لدى العديد من النساء [3] واصابات الاذن وغيرها من الاصابات الخارجية والتي اصبح العديد منها مقاوماً للمضادات الحيوية المستعملة [١] . وتختلف البكتريا في مثل هـــذه الاصـــابات الخارجيـــة فـــي استجابتها للمضادات التي تعطى عن طريق الفم او الادوية ذات الاستعمال الخارجي مثـــل المـــراهم، وعلـــى العموم فان سوء الاستعمال وكثرته ادت الى ظهور المقاومة [5,4].

ومن جهة اخرى يلاحظ ان لمركب ثنائي الاستيل (Diacetyl) فعلية تثبيطية جيدة تجاه العديد مـــن الاحياء المجهرية وعلى وجه الخصوص البكتريا [٦، ٧، ٨، ٩]،وثنائي الاستيل احد مركبات النكهـــة للزبـــد المنضج [١٠].

اجريت هذه الدراسة قي محاولة لايجاد مادة ذات مدى واسع من التأثير او الفعالية لاســـتعمالها ضـــد الاصابات السطحية التي اصبحت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات قيد الاستعمال .

المواد وطرق العمل

مركب ثنائي الاستيل Diacetyl : مزود من قبل شركة Fluka.

العزلات البكترية : تم الحصول عليها من الحالات الواردة الى مختبرات مدينة الطب للمدة الواقعة بـــين اذار /٢٠٠٢ الى كانون الثاني / ٢٠٠٣ .

تم اعتماد تشخيص العزلات وتحديد حساسيتها للمضادات الحيوية Antibiogramعلى نتائج مختبـرات المستشفيات المذكورة . والمضادات المستعملة فهي كما يأتي :

Ac; Augmentin, 30 µg. An; Amikacin , 30 µg. Am; Ampcillin , 10 µg. Axm; Amoxacillin , 10 µg. C; Chloramphecol , 30 µg. Ca; Ceftazidine , 30 µg. Ce; Cephatoxin , 30 µg. Cf; Ciprofloxacin , 5 µg. Cro; Ceftriaxone , 30 µg. Cx; Cloxacillin , 5 µg. E; Erythromycin, 5 µg. Te; Tetracyclin , 10 µg. Tm; Tobramycin , 10 µg . Ra; Rifmpicin , 5 µg. Co; Co-trimoxzole , 25 µg. Gm; Gentamycin, 10 µg.

دراسة التأثير التثبيطي لمركب ثنائي الاستيل : تم باستعمال طريقة الحفر Well assay [١١] ، واستعمال وسط Hinton –Muller في اطباق بتري بقطر ٩ سم وارتفاع الوسط فيه ٤ ملم ، عملت حفربقطر ٥ ملم . زرعت الاطباق بمزروع ليلي منمى في وسـط المرق المغذي (Nutrient broth) وخفف الى ١:١٠٠ في محلول الملح الفسلجي ثم استعمل ٢، مللتر لنشره على سطح الوسط الغذائي ، ثم عملت الحفر واضيف اليهـا ٥٠ مايكرولتر من تراكيز مركب ثنائي الاستيل التي حددت مـسبقا (٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ مـايكروغرام/ حفرة) بعد تخفيفه في الماء المقطر الدافيء (درجة حرارة ٣٠ –٣٥ ْم). تركت الاطباق لمدة ساعة بدرجة حرارة الثلاجة (٤ ْم) ثم حضنت لليوم الثاني بدرجة حرارة ٣٧ ْم مع استعمال الماء المقطر المعقم كـسيطرة ضابطة .

قرأت النتائج بقياس اقطار تثبيط النمو و إذ ما كانت العزلات حساسة جدا فيستعمل تركيزاً واحداً في الطبق بدلا من اربعة حفر . اعيدت التجربة مرتين وبمكررين لكل تجربة .

النتائـــج والمناقشـــة

تم الحصول على ٧٩ عزلة بكترية من اصابات سطحية مختلفة. ويوضح الجدول (١) مصادر العزلات وارقامها والمضادات الحيوية المقاومة لها .

جدول ١ : العزلات المستعملة في الدراسة والضادات الحيوية المقاوم لها

مصدر العزلة	رقم العزلة وتشخيصها	المضادات الحيوية
مسحات الحروق		
	Pseudomonas	
	1	**Ca,Cro,Cfm,Tm,Gm,Cf**
	2	**Cro,Cfm,Am,Tm,Gm,Cf**
	3	**An**
	4	**Tm,Gm,Cf,ce**
	5	**An,Gm,Ce**

Ca,Ac,Co,Am,Tm,Gm,Cf,Ce	**6**	
Ca,Te,Cro,An,Tm,Gm,Cf,Ce	**9**	
Ca,Cro,An,Ac,Cfm,Am,Tm,Gm,Cf,Ce	**10**	
An,Ac,Tm,Gm,Cf,Ce	**11**	
Am,Ac,Gm,Ce	**12**	
E. coli		
Gm,Ca,Cfm,Cf,Am,Tm	**1**	
Ca,Te,Am,Tm	**2**	
Co,Te,Cro,Cfm,Gm,Ce	**3**	
TE,Axm,Gm,Cf,Cfm	**4**	
An,Ac,Gm	**5**	
Ca,An,Cf	**6**	
Ca,An,Gm,Cf	**8**	
Klebsiella		
Ca,Te,Cro,Ac,Cfm,Gm,Cf,Ce	**7**	
Ca,An,Ac,Cfm,Gm	**9**	
Ra,Axm,Ac,Cro,Co,Am,Tm,Gm,Cf,Ce	**13**	
مسحات حروق **Staphyloccocus**		
Ac,Co,Tm	**4(+)[1]**	
E,Cfm,Ca,Co,Gm,Ce,Cf,An	**5(+)**	
E,Ca,Cx,Am,Tm,Gm,Ce,Cf	**7(alb)[2]**	
Gm	**8(alb)**	
مسحات جروح **Pseudomonas**		
-	**1**	

Ac,Gm,An,Ce	1A	
Am,Ac,Ca,An,Cf,	9	
Am	12	
E.coli		
Cro,Ac,Cfm,Ca,Gm,Cf	3	
Ac,Cfm,Gm,Ce,Cf	4	
Ac,Cfm	7	
-	20	
Ce	21	
Co	27	
Klebsiella		
Gm,Tm,Axm,C	2	
Staphyloccocus		
Ce,Ac	1(+)	
-	1A	
Co	2	
Ac,Cfm,Cf	5(+)	
-	21	
مسحات جروح Proteus		
Axm	1	
Ac,Gm,An	2	
Cf	3	
Am,Ac,Ca,Ce,Cf	8	
Enterobacter		
Am,Cro,Gm,Ce,Cf,An	6	

قيح الجروح Pus		
E.coli		
Gm,Axm	34	
-	44	
Staphylococcus		
-	2(+)	
Ac,Co,Gm,Ce,Cf,An	3(+)	
-	6(+)	
مسحات الجلد		
E. coli		
Ra,Co	12	
مسحات مهبل		
Pseudomonas		
Ce,Gm,Tm	7	
Staphylococcus		
Gm,Am,Ca,Ce,Cf	5(+)	
مسحات الاذن		
Pseudomonas		
Gm	1	
An,Ce,Ca,Gm,Cf	1A	
C,Gm,An,Ce	2	
Am,Tm,Gm,Ce	3	
Ac	4	
Gm,An	5	
Ac,Gm,Cf	6	
Ac	6A	
Gm,Cf,Ce	7	
-	7A	

Cf	**8**	
Am,Tm,Cfm,Gm,Ce,Cf	**8A**	
Am,Co,Tm,Cfm,Ca,Ce	**9**	
Am,Co,Cfm,Ce	**10**	
Am,Co,Cfm,Ce	**11**	
Am,Co,An	**12**	
Am,Co,Tm,Cfm,Gm,Ce,Cf	**13**	
Tm,Ac,Ca,Ce,Cf	**14**	
E.coli		
Ce,Co,An	**24**	
Klebsiella		
Co,Gm,Ra,Am	**4**	
Co,Axm,C	**6**	
Co,Gm,Tm,Axm,Am,C	**9**	
Na,Tm,Cf	**9A**	
Gm,Tm	**11**	
Proteus		
-	**16**	
Strep, faecalis		
Tm	**9**	

(٤) + العزلة موجبة لفحص Coagulase

(٥) alb العزلة *Staphylococcus albus*

(٦) – لم يجري الفحص نظرا لعدم توفر المضادات الحيوية حين ورود النموذج.

ويتضح من الجدول اعلاه ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تشكل النسبة الكبيرة ٣و٨٢% وكانت الاغلبية هي بكتريا Pseudomonas ٥٧% تلتها بكتريا E. coli ٢٦% ، وتشير النتائج الى ان اغلب البكتريا مقاومة لواحد او اكثر من المضادات الحيوية رغم ان الصورة ليست حقيقية نظرا لعدم توفر اقراص

المضادات الحيوية عند ورود النماذج،ولكن يمكن استنتاج ان البكتريا المقاومة لثلاثة من المضادات تصل نسبتها الى حوالي ٥و١٦ % والمقاومة لاربعة مضادات ١٤% والمقاومة لثمانية مضادات ٣و٦ % اما المقاومة لعشر مضادات فهي بحدود حوالي ٥و٢% وبهذا يتضح مدى خطر انتشار هذه العزلات المقاومة في الأصابات الخارجية التي تكون اكثر المصادر لنشر المقاومة بين البكتريا [١] ، بالاضافة الى امكانية انسحابها لتلوث المطهرات والمعقمات [١٢] .

اما تأثير مركب ثنائي الاستيل على العزلات المستعملة في الدراسة فموضح في الجدول ٢ .

جدول ٢ : تأثير تراكيز مختلفة من مركب ثنائي الاستيل على العزلات المستعملة في الدراسة

مصدر العزلة ورقمها	معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)			
	٣٠ مايكروغرام	٦٠ مايكروغرام	١٢٠ مايكروغرام	١٨٠ مايكروغرام
مسحة الحروق	**Pseudomonas**			
١	31	35	-(١)	-
2	NG(2)	NG	NG	NG
3	19.5	21	45	48
4	27	NG	NG	NG
5	R(3)	R	35	40
6	NG	NG	NG	NG
9	21.5	27.5	NG	NG
10	40	49.5	51	62
11	35	47	59	56
12	39	46	NG	NG
	E.coli			
1	NG	NG	NG	NG
2	NG	NG	NG	NG
3	NG	NG	NG	NG
4	15	23.5	31	NG
5	14	26	37	NG

NG	NG	NG	NG	6
NG	NG	NG	NG	8
Klebsiella				
NG	NG	NG	58	7
NG	NG	NG	14	9
56	55	46	35	13
Staphylococcus				
30	30	31	19.5	4(+) [4]
62	49	16	17	5(+)
19.5	16.5	12.5	9	7(alb)
-	14	15	12	8(alb)
Pseudomonas				مسحات الجروح
42	30	18	10	1
NG	NG	34	14	1A
NG	NG	42.5	30	2
NG	NG	45	44	9
E. coli				
NG	NG	44	39.5	3
NG	NG	44	18	4
NG	NG	53	37.5	7
NG	NG	NG	NG	20
NG	NG	NG	NG	21
NG	NG	NG	36	37
Klebsiella				
32	29.5	21.5	13.5	2
Staphylococcus				

29	31	15.5	15.5	1(+)
R	R	R	R	1A
50	44	22	15	5(+)
R	R	R	R	2
NG	NG	NG	NG	21
Proteus				
NG	NG	NG	NG	1
-	30	25	8.5	2
NG	NG	NG	NG	3
41	39	21	16	8
E.coi				قيـــح
NG	NG	NG	NG	34
NG	NG	NG	NG	44
Staphylococcus				
-	22	14.5	R	2(+)
34.5	25.5	21.5	13	3(+)
26	19.5	R	R	6(+)
E. coli				مسحات جلد
NG	NG	NG	NG	12
Pseudomonas				مسحات المهبل
R	R	R	R	7
Staphylococcus				
NG	NG	NG	NG	5(+)
Pseudomonas				مسحات اذن
R	R	R	R	1
68	64	60	55	1A
NG	52	40	21	2
NG	NG	51	48	3
41	35	16	11	4
58	55	14	12	5
R	R	R	R	6
-	30	25	9	6A
NG	NG	NG	NG	7

NG	**NG**	**NG**	**NG**	**7A**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**8**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**8A**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**9**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**10**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**11**
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**12**
30	**30**	**18**	**R**	**13**
70	**60**	**28**	**R**	**14**
E.coli				
NG	**NG**	**NG**	**NG**	**24**
Klebsiella				
-	**28**	**13.5**	**8.5**	**4**
-	**35**	**21.5**	**19.5**	**6**
33	**24.5**	**15.5**	**14.5**	**9**
R	**R**	**R**	**R**	**9A**
R	**R**	**R**	**R**	**11**
Proteus				
39	**37**	**15.5**	**9.5**	**16**
Strep. faecalis				
15	١٦	**15.5**	**R**	**9**

(٤) – لم يجر الفحص

(٥) NG: No growth اي ان العزلة حساسة جدا

(٦) R: Resistant اي ان العزلة مقاومة

ويتضح من النتائج ان اغلب السلالات هي حساسة لمركب ثنائي الاستيل وان البكتريا الموجبة اظهرت مقاومة بنسبة ٣و٦% لاقل تركيز ، اما نسبة البكتريا الموجبة المقاومة لكافة التراكيز فيصل الى ٥و٢% اذ ان البعض منها يثبط بارتفاع التركيز وهذا يتفق مع دراسات اخرى [١٣].ومما تجدر الاشارة اليه ان الانواع البكترية التي اظهرت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية كانت حساسة او حساسة جدا إذ لم تستطع النمو بوجود ثنائي الاستيل فمثلا العزلات Pseudomonas (رقم ١٥) وعزلة Klebsiella (رقم ١٣) المقاومة لعشر من المضادات الحيوية كانت حساسة لوجود ثنائي الاستيل . وكذا الحال بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل العزلة Staphylococcusرقم ٥ المقاومة لثمانية من المضادات .

اما عزلات الاصابات الاخرى (غير الجروح والحروق) مثل عزلة Klebsiella عزلة رقم ٩ المقاومة لستة من المضادات الحيوية فقد اظهرت حساسية كبيرة تجاه ثنائي الاستيل . اما عزلات القيح التي شكلت البكتريا العنقودية الموجبة لفحص Coagulase نسبة ٦٠% فقد كانت ذات استجابة موجبة تجاه مركب

ثنائي الاستيل على الاقل بالتراكيز العالية نوعا ما . وكانت العزلة رقم ٣ والمقاومة لستة من المضادات فقد كانت اكثر العزلات حساسية .

والنتائج تشير الى ان عزلات المستشفيات تكون اغلبها مقاومة للمضادات الحيوية [١٤] وان تأثير ثنائي الاستيل هو واسع المدى الذي يشابه مضادات الانتان (Antiseptics) اي ان تأثيره يكون اوسع من تأثير المضادات الحيوية [١٤] ، كما ان Biocides التي يمكن ان ينتمي اليها مركب ثنائي الاستيل قد يكون لها اكثر من هدف مقارنة بالمضادات التي لها اهداف محددة داخل او خارج الخلايا وبذلك فأن التداخل مع سطوح الخلايا ومكوناتها يكون مؤثرا بشكل كبير في تحديد حيوية الخلايا [١٥، ١٦] . ومن جهة ثانية يمكن زيادة كفاءة مركب ثنائي الاستيل بخفض الاس الهيدروجيني [١٣] ومثل هذه الستراتيجية يمكن ان تفيد في التأثير على العزلات المقاومة مثل العزلة رقم ٧ من بكتريا Pseudomonas المعزولة من مسحة المهبل ، اذ ان التأثير المسجل كان في الاس الهيدروجيني لوسط Hinton –Muller الذي يتراوح اسه الهيدروجيني ٤و٧ ± ٢و٠ ، كما ان الكفاءة للمركب يمكن ان تزاد باستعمال طريقة ملائمة للتشكيل (Formulation) واستعمال مضافات اخرى [١٤] وعليه فأنه يمكن ان يستعمل كغسول او بشكل مستحضر رذاذي او اي امكانيات اخرى مثل المراهم وغيرها [١٧، ١٨] .

وبذلك يمكن لمركب ثنائي الاستيل ان يكون من الوسائل المهمة لمعالجة البكتريا السالبة لصبغة كرام على وجه الخصوص التي تشكل فيها الطبقات الخارجية عائقا كبيرا تمنع دخول المثبطات الى الخلايا [١٩، ٢٠] ، كما انه يمكن ان يخلط مع المضادات الاخرى لتسهل مهمتها [٢١] .

References

22- Lyon,B.R. and Skyrroy, R. 1987. *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus : Genetic basis* . Microbiol. Rev. 51: 88-134.

23- Chai, J., Sheng , Z., Yang , H., Diao, L. and Li, L. 2000 . *Successful treatment of invasive burn wound infection wwwith sepsis in patients with major burns* . Clin. Med.J. 113: 1142-1146.

24- Sobel, J.D. 1990. *Bacterial vaginosis* . Br.J.Clin.Parct.Symp.Suppl. 71: 65-69.

25- Wyatt,T.D., Ferguson,W.P., Wilson,T.S. and McCormick,E. 1977. *Gentamicin resistant Staphylococcus aureus associated with the use of topical gentamicin* .J. Antimicrob. Chemother. 3: 213-217.

26- Nobel,W.C. and Naidoo,J. 1978. *Evolution of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus : the role of the skin* . Br.J.Dermatol. 98: 481-489.

27- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . I- Escherichia coli . J.Milk Food Technol. 37: 510-516.

28- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . II- Salmonella typhimurium . J.Milk Food Technol. 37: 539- 544.

29- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . III- Staphylococcus aureus . J.Milk Food Technol. 37:545-550.

30- Kulshrestha,D.C. and Marth,E.H. 1974. *Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk* . IV- Streptococcus lactis . J.Milk Food Technol. 37:593-599.

31- Vandenbergh,P.A.1993. *Lactic acid bacteria , their metabolic products and interference with microbial growth* . FEMS Microbiol. Rev. 12: 221-238.
32- Barry,A.L. 1986 .*Procedure for testing antimicrobial agents in agar media : Theoretical considerations* .In " Antibiotics in Laboratory Medicine " Ed. V.Lorian . Willams & Wilkins : Baltimore & London. P 1-26.
33- Arjunwadkar,V.P., Bal,A.M., Joshi,S.A.,Kagal,A.S. , and Bharadwal,R.S. 2001 . *Contaminated antiseptics, an unnecessary hospital hazard*. Ind. J. Med. Sci. 55: 393-398.
34- Jay.J.M. 1982. *Antimicrobial properties of diacety*l . Appl. Environ. Microbiol. 44: 525- 532.
35- McDonnell,G. and Russell, D. 1999. *Antiseptics and disinfectants* : Activity , Action, and Resistance. Clin .Microbiol.Rev. 12: 147-179.
36- Power, E.G.M. 1995. *Aldehydes as biocides. Prog.Med*. Chem. 34: 149- 201.
37- Russell,A.D. 1994. *Glutaraldehyde: Current status and uses* . Infect.Cpntrol. Hosp.Epidemiol. 15: 724-733.
38- Cleeland,R.and Grunberg, E. 1986. *Laboratory evaluation of new antibiotics in vitro and experimental animal infections* . In"Antibiotics in Laboratory Medicine . Ed. V. Lorian . Willams & Wilkins : Baltimore & London . p 825-876.
39- Steve, L., Goodhart, P. and Alekander,J. 1979. *Hydrotherapy burn treatment : Use of chloramines-T"against resistant microorganisms*".Arch.Phys. Med. Rehabil.60:301-303.
40- Ayres, H., Furr,J.R. and Russell, A.D. 1993. *A rapid method of evaluating permeabilizing* . Lett. Appl. Microbiol. 17: 149-151.
41- Hancock, R.E.W. 1984. *Alterations in membrane permeability* . Annu.Rev. Microbiol. 38: 237-264.
42- Scher, K.S. and Peoples, J.B. 1991. *Combined use of topical and systemic antibiotics* .Am.J.Surg. 161: 422-425.