DETECTION OF MULTIDRUG EFFLUX SYSTEM IN MULTIDRUG RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* CLINICAL ISOLATES

Thesis submitted to Medical Research Institute
Alexandria University
In partial fulfillment for the degree of

Master

in

Diagnostic and Molecular Microbiology

By

Mohammed Abd El Karim Abd El-Mohsen El Kholy

Bachelor of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy
University of Alexandria, 2008

Medical Research Institute
Alexandria University
2013

الملخص العربى

تعتبر الايشيريشيا كولاى من الميكروبات الكائنةبالأمعاء فى الإنسان والثدييات الأخرى. وهى من الميكروبات التى لها علاقة بالإصابة بالعدوى الناجمة من المستشفيات ومن المجتمع. كذلك فهى تعد منأهمأسبابالإصابة بالتهابات مجرى البول،إضافة إلى كونهاأحد المسببات الرئيسيةللإصابةبالإسهال، ويمكنها كذلك الانتشار إلى الدم، ومن الممكن أن تؤدى إلى صدمة تسممية ينتج عنها مضاعفات خطيرة ومميتة .

وقد لوحظ فى فى السنوات الأخيرة أنتشارا واسع النطاق لسلالات من الايشيريشيا كولاى المقاومة للمضادات الحيوية واسعة المجال، وأن ظهورهذه المقاومة أصبح يشكل خطرا على الصحة العامة خاصة فى الدول النامية بسبب سوء استخدام المضادات الحيوية ، كذلك كثرةاستخدامها بلا داع.

وقد وجدأن الميكروبات المقاومة للعديد من المضادات الحيوية تستخدم الكثيرمن الطرق للتغلب على هذه المضادت الحيوية، وأنالإخراج النشط للمضادات الحيوية يمثل احد أهم الطرق لمقاومة عمل المضادات الحيوية، كماأظهرت الدراسات الإكلينيكيةأن مضخات الإخراج تلعب دورا حيويا فى عملية المقاومة للعديد من المضادات فى مناطق جغرافية متعددة وفى شعوب عدة.

وقد أظهر التحليل الجينى أن العديد من الجينات تعد مسئولة عن عملية الإخراج النشط للمضادات الحيوية وتوجد هذه الجينات على عدة كروموسومات فى اغلب أنواع البكتيريا. و قد تم التوصل لمعرفة الترتيب الجينى بأكملهوتحديده لبكتريا ايشيريشيا كولاى عام 1997.

ويتكون كروموسوم الايشيريشيا كولاى من 4.6 مليون زوج من القواعد النيتروجينية محملا عليه ما يقرب من 4300 اطارا مقروناً مفتوحا ORFs() ، من بينهم 354 اطارا يعتقد انهم جينات مسئولة عن نقل المواد من و إلى البكتيريا متضمنة 37 من الأطر المسئولة عن مضخات الإخراج (مضخات طاردة) العديد منها مسئول عن مقاومة الأدوية . ومن بين الـ 37 اطارا وجد أن هناك عدد 20 من الجينات تساهم فى مقاومة الايشيريشيا كولاى للأدوية. تعد المضخات الطاردة التابعة لعائلة (RND) ذات أهمية خاصة مقارنة بباقى العائلات الخمس المسئولة عن مضخات الإخراجفى المقاومة الشديدة لأنواع عديدة و مختلفة من المركبات داخل الايشيريشيا كولاى.

تعتبرمضخة AcrAB–TolCلبكتريا ايشيريشيا كولاى مسئولة عن مقاومة العديد من المضادات الحيوية المختلفة و المركبات الأخرى. و قد وجد أن المضخة AcrAB–TolCلبكتريا ايشيريشيا كولاى تتكون من ثلاثة أجزاء، AcrB و هو بروتين موجود بالغشاء الداخلى للخلية و AcrA و هو بروتين رابط موجود بالغشاء البينى وأخيرا TolC و هى قناة الإخراج بالغشاء الخارجى .

إن الخصوصية الشديدة لمضخات الإخراج تمثل الركيزة الأساسية لعمل المقاومة، وتم تأكيد هذه الحقيقة بتثبيط جين*acrAB*، مما جعل بكتيريا ايشيريشيا كولاى أكثر عرضة ليس فقط للعديد من الصبغات بل أيضاإلى المنظفات والعديد من المضادات الحيوية مثل الماكروليد والبيتالاكتام والتيتراسيكلين والكلورامفينيكول وحمض الفيوسيديك والنوفوبيوسين دونالامينوجليكوزايد.

ولبحث مشكلة مضخات الإخراج و تأثيرها على تقليل التركيز النشط للمضادات الحيوية داخل الخلية فقد كان من الضرورى دراسة هذا الموضوع واستحداث وسائل لبحث عمل مضخات الإخراج.كما أن تثبيط مضخات الإخراج تبدو من السبل الجاذبة للتغلب على مشكلة مقاومة تأثير الأدوية, وأن من الممكن استخدامها لزيادة تركيز المضاد الحيوية داخل الخلايا المصابة مما يجعل الأدويةأكثر فاعلية.

و حيث أن تشخيص المقاومة الناتجة عن الإخراج و التى تعتمد فقط على الطرق الشكلية لا تقدم معلومات كافية، مما يجعلنا نلجأ إلى التشخيص عن طريق الحمض النووى ليس فقط للتعرف على الميكروبات المسببة للأمراض ولكن أيضا لتحديدالبصمة الوراثية للميكروب.

لذا فإن الغرض من هذه الدراسة هو بحث مقاومة بكتريا الايشيريشيا كولاى المعزولة اكلينيكيا للعديد من المضادات الحيوية و الكشف عن المقاومة الناتجة عن مضخات الإخراجلبعض المضادات الحيوية و ذلك باستخدام الطرق الشكلية ، إضافة إلى التقنيات الجزيئية.كما تم دراسةانعكاس هذه المقاومةعند استخداممثبط للمضخة الطاردةفيالعزلاتالسريرية.

اجريت هذه الدراسة على40 عترة من بكتيرياالايشيريشيا كولاى المقاومة للعديد من المضادات الحيوية. تم عزل هذه العينات من (البول,مسحات الجروح, الدم والبصاق) من مرضى تم حجزهم فى مختلف المؤسسات العلاجية وتشمل (معهد البحوث الطبية, المستشفى الرئيسى الجامعى) فى الفترة ما بين نوفمبر 2011 الى يناير 2012. تم حفظالعينات عند درجة حرارة سالب 80 درجة منويةفى وسط لوريا برتانى (LB) مزود بجليسرول 10% حتى إجراء التجارب اللاحقة.

وقد تم اختبار هذه العزلات بالطرق التقليدية للتأكد منها، ايضا تم اختبارها لمدى حساسيتها للمضادات الحيويةوالتى تشمل: الاميكيسين, توبراميسين, جينتاميسين,اوفلوكساسين, سيبروفلوكساسين, نورفلوكساسين, ليفوفلوكساسين,تيتراسيكلين, سيفترياكسون,سيفتازيديم,سيفوتاكسيم, امبيسيلين سلبكتام, اموكسيسيلين كلافولينيك,والترايميثوبريم سلفا ميثوكسازولبطريقة الانتشار القرصى(Kirby Bauer).

كذلك استخدمت طريقة التخفيف فى السائل لتعيين التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا الخاص بعقارليفوفلوكساسين , جينتاميسين , سيبروفلوكساسين و سيفترياكسون تجاه العترات المختبرة فى وجود و عدم وجود هيدروكلورايد الميفلوكوين – كمثبط للمضخة الطاردةلاختبار تأثيرالمثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية.

أيضا تم الكشف عن جين *acrA* and *acrB* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل وإجراءالتقدير الكمى AcrA-AcrB-TolC MDR لنظام مضخات الإخراج الثلاثى فى عترات الايشيريشيا كولاى بالمقارنة بسلالة المنشأ.

أظهرت الدراسة النتائج الآتية:

1. من بين الـ 40 عترة تم عزل 7عترات من الدم (17.5%) , 21 عترة من البول (52.5%) , 4 عترات من البصاق(10%) , 8 عترات من الجروح (20%)
2. اظهرت الأربعونعترة مقاومة للمضادات الحيوية الآتية سيفوتاكسيم , سيفترياكسون , سيفتازيديم , نورفلوكساسين , اوفلوكساسين , ليفوفلوكساسين , سيبروفلوكساسين , توبراميسين , وجينتاميسين بنسبة (100%) مقاومة للاميكيسين , امبيسيلين سلبكتام , اموكسيسيلين كلافوليتيك , تيتراسيكلين وسلفاميثوكسازول كما هو موضح بالترتيب بنسبة (55%) , (95%) , (92.5%) , و (95%)
3. أوضحت العينات نقص فى قيم التركيز الادنى للتثبيط فى وجود المثبط للمضخة الطاردة كالتالى:

أ- فى حالة الليفوفلوكساسين تراوحتقيم التركيز الادنى للتثبيط فى غياب هيدروكلورايدالميفلوكوينبين (8-128) µg/ml، بينمالوحظ انه فى وجود هيدروكلورايدالميفلوكوينان النقص فى تركيز الحد الأدنى للتثبيط قد تراوح بين µg/ml (8-0.25). نقص قيم تركيز الحد الأدنى للتثبيط تراوح بين (8-128)ضعف

ب- فى حالة السيبروفلوكساسين تراوحت قيم التركيز الادنى للتثبيط فى غياب هيدروكلورايدالميفلوكوين بين µg/ml (512-64)، بينما لوحظ انه فى وجود هيدروكلورايدالميفلوكوينان النقص فى تركيز الحد الأدنى للتثبيط قد تراوح بين µg/ml (256 -1). نقص قيم تركيز الحد الأدنى للتثبيط تراوح بين (2-512)ضعف.

ت- أما فى حالة الجينتاميسين تراوحت قيم التركيز الادنى للتثبيط فى غياب هيدروكلورايدالميفلوكوين بين µg/ml (512-16)، بينما لوحظ انه فى وجود هيدروكلورايدالميفلوكوينان النقص فى تركيز الحد الأدنى للتثبيط قد تراوح بين µg/ml (512 -2). نقص قيم تركيز الحد الأدنى للتثبيط تراوح بين (8 -0) ضعف.

ث- أما بالنسبة للسيفترياكسون تراوحت قيم التركيز الادنى للتثبيط فى غياب هيدروكلورايدالميفلوكوين بين µg/ml (512-16)، بينما لوحظ انه فى وجود هيدروكلورايدالميفلوكوينان النقص فى تركيز الحد الأدنى للتثبيط قد تراوح بين (128 -0.25). نقص قيم تركيز الحد الأدنى للتثبيط تراوح بين (1024 -4) ضعف.

4. 95% من العترات المقاومة لعقار الليفوفلوكساسين استعادت حساسيتها للعقار فى وجود هيدروكلورايد الميفلوكين (الحد الأدنى للتثبيط ≤ 2 µg/ml) وذلك طبقا للنقطة الفاصلة المذكورة فى معهد القياسات الإكلينيكية و المعملية (CLSI).

%5 من العترات المقاومة لعقار للسيبرو فلوكساسين استعادت حساسيتها للعقار فى وجود هيدروكلورايد الميفلوكين (الحد الأدنى للتثبيط ≤ 1 µg/ml) وذلك طبقا للنقطة الفاصلة المذكورة فى معهد القياسات الإكلينيكية و المعملية (CLSI).

5 % من العترات المقاومة لعقار للجينتاميسين استعادت حساسيتها للعقار فى وجود هيدروكلورايد الميفلوكين (الحد الأدنى للتثبيط ≤ 4 µg/ml) وذلك طبقا للنقطة الفاصلة المذكورة فى معهد القياسات الإكلينيكية و المعملية (CLSI).

62.5 % من العترات المقاومة لعقار للسيفترياكسون استعادت حساسيتها للعقار فى وجود هيدروكلورايد الميفلوكين (الحد الأدنى للتثبيط ≤ 1 µg/ml) وذلك طبقا للنقطة الفاصلة المذكورة فى معهد القياسات الإكلينيكية و المعملية (CLSI).

5. باعتبار أن *acrA* and *acrB* تعتبر جينات داخلية ، فإن جميع العينات أظهرت هذه الجينات عند الكشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلى فى (100 %)

6. وكانتالزيادةفيالتعبير الجينى لكلمن *acrA* و *acrB* تقدربمتوسط 3.98 و 2.554 ضعف علىالتوالي. و كان متوسط الزيادةفيمستوياتالتعبير لكلمن *acrA* و *acrB* فيالعزلاتالسريرية لبكتريا ايشريشياكولايالمتعددة المقاومة (3.9±1.58) و (2.6±1.09) علىالتواليمقارنةمعأولئكمنالسلالةالقياسية ATCC. وكانت هذهالفروقبينمستوياتالتعبير للجيناتذاتدلالةإحصائية(p < 0.001). كما كانهناك تناسبا طرديا قويابينمستوياتالتعبير لكلمن جين *acrA* و *acrB* ($p < 0.001$).

7. التقييم الكمى للتعبير الجينى لجين *acrA* and *acrB* لخمس عينات فى غياب وفى وجود المضاد الحيوى (ليفوفلوكساسين 3 ميكروجرام / ميليليتر) بالمقارنة ب housekeeping gene *rpsL* وجدت زيادة ملحوظة وهامة فى مستوى التعبير عن *acrA* and *acrB* فى العينات المختارة بمتوسط 5.86 و 3.44 ضعف بالتوالى بالمقارنة بمستويات ال ATCC لسلالة الايشيريشيا كولاى

مما سبق نستخلص ما يلي:

- حيث ان البكتيريا المقاومة للعديد من المضادات الحيوية تعد السبب الرئيسى لفشل علاج الإمراض المعدية مما يؤدى الى زيادة نسبة الإصابات المرضيةوزيادة نسبة الوفيات وزيادة نفقات الرعاية الصحية لذلك كان من الضرورى الحد من استخدام المضادات الحيوية بطريقة عشوائية حيث انها قد تزيد من انتشار هذه العزلات المقاومة للمضادات الحيوية.

- ان الخيارات المتاحة لعلاج العدوى التى تسببها بكتيريا مقاومة للعديد من المضادات الحيوية محدودة . ذلك فإن النتائج الواعدة والملحوظة عند اختبار المثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية على هذه العزلات قد تمهد الطريق لانتاج عقارات قد يكون لها اكبر الاثر في الحد من انتشار هذه السلالات البكتيرية الشديدة الضراوة ولكن هذا المثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية قد يحتاج لتقييم اثره الصحى حتى تكون الاستفادة منه بالغة.

- ان طرق التشخيصالشكلية والجينية التى يتم استخدامها للكشف عن عترات الايشيريشيا كولاى المقاومة للعديد من المضادات الحيوية بواسطة *acrABtolC* بالرغم من كونها تبدو واعدة إلاأنها تحتاج الى اختبارها على عدد اكبر منالعترات حيث أن التثبيط لمضخات الإخراج تبدو وسيلة جذابة للتغلب على مشكلة مقاومة الأدوية.

- الحاجة الى دراسات اخرى لاستكشاف طرق حديثة للتداخل مع التعبير وعمل مضخات الإخراج.