Microbiological Study on Diabetic Foot Infections

Thesis

Submitted in fulfilment for the

Ph. D. in Pharmaceutical Sciences

(Pharmaceutical Microbiology)

By

Rania Ragab Torky Abo-Zahra
M. Sc. Pharmaceutical Microbiology

Supervision Committee

Dr. **Ahmed Ahmed Abd El-Aziz**
Professor of Microbiology,
Faculty of Pharmacy ,
Tanta University

Dr. **Tarek El-Said El-Banna**
Professor and Head of
Microbiology Department
Faculty of Pharmacy ,
Tanta University

Dr. **Amal Mostafa Abo-Kamar**
Professor of Microbiology,
Faculty of Pharmacy,
Tanta University

Dr. **Abeer Abd El-Rahim Ghazal**
Assistant Professor of Microbiology
Medical Research Institute
Alexandria University

FACULTY OF PHARMACY
TANTA UNIVERCITY
2011

Abstract

Introduction:

The diabetic foot syndrome is clearly one of the most important complications of diabetes and is the most common cause of hospitalization among diabetic patients. *Staphylococcus aureus* is found to be the commonest pathogen present in diabetic foot infections. The aim of the present study is to evaluate the *in vitro* activities of three different types of antibiotics against staphylococcal biofilm and planktonic cultures, and to estimate the biofilm formation in response to stress factors such as glucose and sub-inhibitory concentrations of antibiotics by using scanning electron microscope. Also to study the efficacy of the antibiotics on the healing of infected wounds before and after the formation of biofilm.

Materials and methods:

A total of 196 bacterial isolates were used in this study. These isolates were recovered from 150 specimens which were collected from the foot ulcers of diabetic patients admitted in the Gangrene unit, University hospital, Faculty of Medicine, Alexandria University. Samples were collected during the period from September 2007 till July 2008. These specimens contained 88 pure infections, 52 mixed infections and 10 specimens were free from microorganisms. Biofilm formation of all isolates was determined by the modified microtiter plate method, then the effects of different concentrations of several antibiotics (including ciprofloxacin, gentamycin and amoxicillin-clavulanic acid) on eight staphylococcal isolates were studied. Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* isolate 45S were made in order to determine the biofilm formation in the presence of glucose and sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin. The PCR technique for detection of *icaA* and *icaD* genes was applied to 19 staphylococcal strains, 8 of them were strong biofilm formers, 9 moderate and 2 non-biofilm formers. Then the efficacy of the antibiotics on the healing of infected wounds before and after the formation of biofilm was also studied.

Results and conclusion:

The most predominant bacterial isolate in all diabetic foot swab samples collected was found to be Staphylococcus species (86, 44%), the others were Pseudomonas

species (42, 21%), Proteus species (26, 14%), *Escherichia coli* (24, 12%) and Klebsiella spicies (18, 9%). Out of 86 Staphylococcal isolates, eight were found to be strong biofilm formers. Sub-inhibitory concentrations of the antimicrobial agents used increased the biofilm formation of two isolates. However, the preformed biofilms were very difficult to be removed even with 128 multiple of the minimal inhibitory concentration (MIC) in some isolates. Interestingly, the biofilm minimal bactericidal concentration (MBC) reached 512 times the planktonic MBC in 3 isolates. Increasing the antibiotic concentration up to 128 fold MIC failed in the complete removal of the preformed biofilms of some of the tested isolates. Scanning electron micrographs of *S.aureus* isolate 45S showed that the slime layer production increases in the presence of glucose and low concentration of ciprofloxacin. Only 6 *S.aureus* isolates gave positive results for both *icaA* and *icaD* genes, while the others gave negative results for both genes. Monitoring the infected wound healing in case of the diabetic rat model revealed that, the treatment was more efficient when it started immediately after infection, before the formation of the biofilm.

Key words: Diabetic foot infections, Staphylococcus, biofilm, antibiotic, scanning electron microscope, *in vivo* rat model.

الملخص العربي

يعتبر القدم السكري من اهم المضاعفات الناتجة عن مرض السكر، وهو من أهم الاسباب التى تؤدى الى دخول مرضى السكر الى المستشفي. كما أن القدم السكري يؤدى إلى معظم جراحات بتر الأطراف و يسبب الوفاة أحيانا. و يحتاج علاج قرحة القدم السكري إلى مصروفات باهظة و خاصة إذا تطلب ذلك بقاء المريض في المستشفى، و ذلك يمثل استنزافا كبيرا للموارد و الخدمات الصحية.

لقد تم إجراء هذا البحث على ١٥٠ مريض من الذكور والإناث المصابين بمرض القدم السكرى المحجوزين بوحدة الغرغرينة بالمستشفى الجامعى بجامعة الاسكندرية. وتم جمع مسحات من جروح القدم السكرى. و قد اشتملت هذه الدراسة على ٩٠ من الذكور و ٦٠ من الإناث تتراوح أعمارهم ما بين ٣٨ إلي ٧٦ عاما، و يعانون من مرض السكر لمدة تتراوح من ٢-٤٠ سنة. وتراوحت المضاعفات الناتجة عن مرض القدم السكري ما بين تقرحات القدم السطحية إلى بتر أعلى الركبة.

و قد وجد انه من بين الحالات (١٥٠حالة) التى شملتها هذه الدراسة كانت هناك ٨٨ عينة (٥٩%) مصابة بنوع واحد من البكتيريا، و ٥٢ حالة (٣٥%) مصابة باكثر من نوع من البكتيريا، و ١٠ حالات (٦%) كانت خالية من الاصابة بالبكتيريا.

و قد تم فصل ١٩٦ عزلة من كل العينات و تبين أن ٨٦ منها كانت موجبة الجرام بينما كانت ١١٠ عزلة سالبة الجرام. ولقد أظهرت النتائج أن البكتيريا السائدة كانت من جنس استافيلوكوكاس. و تحتوى هذه البكتيريا على مكورات عنقودية ذهبية (استافيلوكوكاس أورياس) بنسبة ٣١% من العينات و مكورات عنقودية اخرى سالبة الكوأجولاز بنسبة ١٣% من العينات. أما بالنسبة للبكتيريا سالبة الجرام فكانت تحتوى على جنس بسودوموناس بنسبة ٢١%، و بروتيوس بنسبة ١٤% و الايشيريشيا كولاى بنسبة ١٢%و الكلبسيلة بنسبة ٩% من العينات.

و قد خضعت جميع العينات للاختبار لبيان مدى قدرتها على الالتساق و عمل اغشية حيوية، و ذلك بواسطة اختبارات كيفية مثل اختبار الانبوبة او الزراعة على وسط كونجو ريد. و ايضا اختبارات كمية و ذلك بواسطة طريقة اطباق الميكروتيتر المعدلة. وتراوحت قراءات ال ODs للاغشية الحيوية مابين ٠,٠٩٢ و ٠,٦٥٩ . ووجد أن ١٨ (٩%) عزلة من البكتريا تكون اغشية حيوية بصورة قوية فى حين أن ٨٨ (٤٥%) عزلة تكون أغشية حيوية

بصورة متوسطة، بينما كانت ٨٠ (٤١%) عزلة ضعيفة في تكوين الاغشية الحيوية كما وجد ان ١٠ (٥%) عزلات لا تكون اغشية حيوية.
كما تم عمل اختبار حساسية لعدد ٥٢ عزلة من البكتيريا مكونة من ٢٣ من جنس استافيلوكوكاس و ١٢ من جنس البسودوموناس و ٨ بروتيوس و ٥ كلبسيلة و ٤ اشيريشيا كولاى.
و لقد تم عمل هذا الاختبار باستخدام ٢٢ مضادا حيويا وأجري باستخدام طريقة الانتشار من الاقراص الي الأجار. وقد وجد أن معظم العزلات متعددة المقاومة.
كما تم في هذا البحث الكشف عن دور إنزيمات البيتالاكتاميز فى مقاومة البيتالاكتامات بين العزلات المختلفة ووجد أنه ٢٣/٢٠ (٨٦.٩ ٪) من عزلات الاستافيلوكوكاس منتجة للبيتالاكتاميز منها عزلتان كانتا حساستين للأمبيسلين، في حين أن ٦٠ ٪ من الكلبسيلة و ٢٥ ٪ من الاشيريشيا كولاى كانت منتجة للبيتالاكتاميز.
كما تم أيضا دراسة وجود ظاهرة الارتجاع بطريقة فلوريمترى كميكانيكية للمقاومة للمضادات الميكروبية و ذلك لعزلة الاستافيلوكوكاس الذهبية 45S وأظهرت النتائج أن هناك انخفاض ملحوظ في وميض بروميد الإيثيديوم كنتيجة للخروج النشط له من الخلايا و قد وجد ان إضافة مادة الريزربين (مثبط للارتجاع) تؤدى إلى منع ارتجاع بروميد الاثيديوم. و اكدت هذه النتائج دور الارتجاع كميكانيكية لمقاومة الاتافيلوكوكاس للكينولون.
ثم تم استخدام ٨ غزلات من الاستافيلوكوكاس التى تتميز بالانتاج القوى للاغشية الحيوية فى مواصلة البحث. حيث تم تعيين قراءات ال MICs و ال MBCs لكل منهم. بالاضافة الى مقارنة قدرة المضاد الحيوى علي قتل البكتيريا فى حالة صورة حرة او فى الاغشية الحيوية.و وجد ان التركيز المطلوب من سيبروفلوكساسين لقتل البكتيريا فى حالة وجودها في الاغشية الحيوية قد يصل من ٢ الى ٥١٢ مرة اعلى من التركيز المطلوب في حالة وجودها فى صورة حرة. كذلك في حالة الجنتاميسين (من ٢ و حتى ٢٥٦ مرات أعلى) و أيضا الاموكسيسللين كلافيولانيك اسيد (من ٤ و حتى ٦٤ مرة أعلي).
كما انه وجد في حالة استخدام تركيزات من المضاد الحيوى اقل من الMICs ان العزلات لها سلوك مختلف حيث انه ادى الي تقليل الغشاء الحيوى فى ٧٥% من العزلات المستخدمة بينما ادى الى زيادته في ٢٥% من العزلات.