DETECTION OF MULTIDRUG RESISTANCE EFFLUX PUMP IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS RESISTANT TO FLUOROQUINOLONES.

A Thesis
Submitted to Medical Research Institute
Alexandria University
In partial fulfillment of the degree of

Master

In

Diagnostic and Molecular Microbiology

By

Ingy Ibrahim Mahmoud El-Soudany

Bachelor of Pharmaceutical Sciences
Faculty of Pharmacy, Alexandria University

A. Libr.
Faculty of Pharmacy
Serial no. G1150
579

Microbiology Department
Medical Research Institute
Alexandria University

2012

الملخص العربي

الميكروب الصديدي الاخضر يعتبر من مسببات الامراض الانتهازية وعدوي المستشفيات. ويمكن ان يسبب للمرضي ذي المناعة الضعيفة التهابات في المسالك البولية , مجرى الدم , الجروح و في الجهاز التنفسي و خاصة المجموعات المُعرّضة للخطر لا سيما المرضى الذين يحتاجون إلى البقاء طويلا في وحدات العناية المركزة و ضحايا الحريق ومرضى السرطان ومرضى التليف الكيسي.إن العدوي الناجمة عن الميكروب الصديدي الاخضر كثيراً ما يصاحبها حالات مرضية و وفيات.

يتميز الميكروب الصديدي الاخضر بدرجة عالية من المقاومة الذاتية لمجموعة متنوعة من المضادات الحيوية مما يجعل عدد محدود من المضادات الحيوية فعّالة ضده. إن المضادات الحيوية الوحيدة المتاحة لعلاج هذا الميكروب و الذي يمكن تناوله عن طريق الفم تنتمي الي مجموعة الفلوروكوينولون مثل نورفلوكساسين والسيبروفلوكساسين. و مع ذلك، فإن الميكروب الصديدي الاخضر وبعض أنواع البكتيريا الأخرى سريعاً ما تقاوم العلاج بالفلوروكوينولون، مما يحد بشدة من استعمال هذه العقاقير. و اذا كان الميكروب مقاوم لنوع من المضادات الحيوية فهو غالبا ما يكون مقاوم لانواع اخري من المضادات الحيوية مختلفون كميائيا.

إن الفلوروكوينولون هي مجموعة من المضادات الحيوية واسعة المجال التي تتناول عن طريق الفم و تُستخدَم للعلاج في المجتمع والمستشفيات على حد سواء. تقاوم البكتريا هذه المجموعة بآليتين : الاولي هي طفرة في مكان نشاط المضاد الحيوي والثانية عن طريق المضخات الطاردة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية. إن الالية الثانية تضفي مستوى متوسط من المقاومة مما يجعلها غير فعالة في الاماكن المصابة وغالبا ما تكون مقاومة لمجموعات اخري من المضادات الحيوية و الذي يصعب التكهن به باختبارات الحساسية الروتينية.

المضخات الطاردة في الميكروب الصديدي الاخضر يمكنها طرد العديد من المركبات من بينها المنظفات و مجموعات مختلفة من الضادات الحيوية من السيتوبلازم او الحيز المحيط بالغشاء الهيولي (periplasmic space). كل مضخة لها مجموعة معينة من المضادات الحيوية تقوم بضخها ومجموعة الفلوروكينولون تُضَخّ بجميع المضخات Mex. تساهم ثلاثة علي الاقل من هذه المضخات وهم: MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexEF-OprN في مقاومة الفلوروكينولون .

إن تثبيط هذه المضخات بمثبطات واسعة المجال يبدو نهجا جيدا لمكافحة و منع مقاومة الفلوروكينولون أو مقاومة مجموعات المضادات الحيوية المتعددة وبالتالي، وتحسين الفعالية السريرية للمضادات الحيوية .

لذا كان الهدف من هذه الدراسة هي دراسة مقاومة عزلات الميكروب الصديدي الاخضر السريرية و البيئية للفلوروكينولون و الكشف عن المضخات الطاردة لليفوفلوكساسين (احدي الفلوروكينولون) في تلك العزلات و ذلك باستخدام الاساليب المظهرية و الجزيئية.

في هذه الدراسة تم جمع ٥٠ عينة من الميكروب الصديدي الاخضر المقاومة لليفوفلوكساسين و قد تم عزلهم من عينات سريرية وعينات بيئية مختلفة. و قد تم الحصول علي العينات من قسم الميكروبيولوجي بمعهد البحوث

الطبية جامعة الاسكندرية في الفترة من يناير ٢٠١٠ الي يناير ٢٠١١. كما تم الحصول على الموافقة الأخلاقية لإجراء هذه الدراسة من مجلس إدارة المستشفى.

تم جمع العزلات من مصادر مختلفة؛ البصاق والبول، والجروح، وتم حفظها في -٧٠ درجة مئوية في Luria broth (LB) به ١٠% جلسرين حتي بدء الاختبارات.

تمت الاختبارات الآتية علي كل العينات:

١- **اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية** الآتية باستخدام طريقة باور و كيربي : سفتازدين,سفيبيم, بيبراسيلين-تازوبكتام,جنتاميسين, اريثروميسين, اميبينم, كاربينيسلين, ليفوفلوكساسين, سيبروفلوكساسين, نورفلوكساسين, و اوفلوكساسين.

٢- **الكشف عن المضخة MexEF OprN بطريقة مظهرية و تحديد ال ادني تركيز مثبط لنمو البكتريا من الليفوفلوكساسين: لليفوفلوكساسين فقط ثم في وجود مثبط المضخات الطاردة Phe-Arg (EPI) β- naphthylamide (PaβN) P4157 .**

٣- **الكشف عن المضخة MexEF OprN بطريقة جزيئية باستخدام RT-PCR .**

نتائج هذه الدراسة كشفت عن الآتي:

١- عينات ميكروب الصديدي الاخضر المقاومة لليفوفلوكساسين كانت تشمل ٤٠ (٨٠%) عينة سريرية و ١٠ (٢٠%) عينة بيئية. و كان مصدر ال ٤٠ عينة السريرية: البول (٦٠٪)، الجروح (١٥٪)، والبصاق (٢٥٪).

٢- جميع العينات (٥٠ عينة) كانت مقاومة لجميع مجموعة الفلوروكينولون المدرجة في هذه الدراسة (الليفوفلوكساسين و السيبروفلوكساسين و النورفلوكساسين و الاوفلوكساسين)

٣- جميع عزلات الميكروب الصديدي الاخضر المقاومة لليفوفلوكساسين كانت مقاومة لاكثر من مجموعة من المضادات الحيوية. فقد كان اكثر نمط مظهري انتشارا النمط المقاوم لليفوفلوكساسين و الكربينيسلين LVX-CAR (١٠٠% ٥٠/٥٠) يليه النمط المقاوم لليفوفلوكساسين والإريثروميسين LVX-E (٩٦% ٥٠/٤٨) ويليه النمط المقاوم لليفوفلوكساسين و السفتازيدين LVX-CAZ (٩٢% ٥٠/٤٦) ثم النمط المقاوم لليفوفلوكساسين و الجنتاميسين و التازوبكتام-كربينيسلين LVX-TZP, LVX-CN (٨٤% ٥٠/٤٢) ثم النمط المقاوم لليفوفلوكساسين والسيفيبيم LVX-FEP (٨٠% ٥٠/٤٠) و اخيرا النمط المقاوم لليفوفلوكساسين والاميبينيم LVX-IPM (٥٨% ٥٠/٢٩).

٤- كان اكثر المضادات الحيوية فاعلية ضد عزلات الميكروب الصديدي الاخضر المقاومة لليفوفلوكساسين في اختبارات الحساسية الاميبينيم IPM بنسبة ٤٢% ويليه السيفيبيم FEP بنسبة ٢٠%. و تراوحت نسبة فاعلية المضادات الحيوية الاخري المدرجة في الدراسة بين ٠% و ٢٠%.

٥- كل عزلات الميكروب الصديدي الاخضر المقاومة لليفوفلوكساسين اظهرت انخفاضا في ادني تركيز مثبط لنمو البكتريا من الليفوفلوكساسين (MIC) بعد اضافة المثبط EPI .فتراوح ادني تركيز مثبط لنمو البكتريا من الليفوفلوكساسينLVX MIC بين ٨-٦٤ ميكروجرام / مل و في المتوسط ٣٢ ميكروجرام / مل بينما انخفض (LVX MIC) في وجود المثبط , EPI PAβN بتركيز (٢٠ ميكروجرام / مللي) بين ٠,١و١٦ ميكروجرام / مل و المتوسط ١ ميكروجرام / مل و قيم الانخفاض في ادني تركيز مثبط لنمو البكتريا من الليفوفلوكساسين (LVX MIC) كان بين ٢ و ٦٤٠ ضعف و المتوسط ٣٢ ضعف.

٦- في هذه الدراسة ٦٠% من العزلات استعادت الحساسية لليفوفلوكساسين باضافة المثبط بينمالم يحدث ذلك في ٤٠% من العينات التي ظلت مقاومة لليفوفلوكساسين (و هذا حسب CLSI the breakpoint of LVX (≤S/R≥=2/4 µg/ml

٧- ٨٨% من هذه العزلات المقاومة لليفوفلوكساسين كانت ذات نمط ظاهري ايجابي حيث انخفض ادني تركيز مثبط لنموها لليفوفلوكساسين (MIC) الي ≤٨ اضعاف في وجود المثبط (PAβN) بينما ٦ (١٢%) من العينات كان انخفاض ادني تركيز مثبط لنموها لليفوفلوكساسين (MIC) >٨ اضعاف.

٨- كانت قيمة ادني تركيز مثبط لنمو ٥٠% من البكتريا)(MIC50) ٣٢ ميكروجرام / مل و قد انخفضت في جود المثبط (EPI, PaβN) الي ١ميكروجرام / مل. بينما قيمة ادني تركيز مثبط لنمو ٩٠% من البكتريا; (MIC90) كانت ٦٤ ميكروجرام / مللي وانخفضت في و جود المثبط (EPI, PaβN) الي٨ ميكروجرام / مل.

٩- كان تأثير المثبط EPI, PAβN يزداد في عزلات الميكروب الصديدي الاخضر ذات المقاومة العالية لليفوفلوكساسين (LVX MIC).

١٠- تم اختبار ٢٧ عينة بطريقة (RT-PCR) للكشف عن المضخة MexEF OprN و حيث كانت ٢٣ (٨٥.٢%) عينة ايجابية بينما ٤ (١٤.٨%) عينة كانت سلبية.

١١- هناك ارتباطا وثيقا بين الطريقة المظهرية و الطريقة الجزيئية في الكشف عن المضخة MexEF OprN فقد كان هناك تطابق كامل بين الطريقتين في ٢١ عينة (٢٠ عينة ايجابية في الطريقتين و عينة واحدة سلبية في الطريقتين). و كان هناك تطابق جزئي بين الطريقتين في ٣ عينات (اي ان الطريقة الجزيئية كانت ايجابية و الطريقة المظهرية كانت سلبية) و هناك تعارض بين الطريقتين في ٣ عينات(اي ان الطريقة الجزيئية كانت سلبية و الطريقة المظهرية كانت ايجابية).

١٢- لا يوجد دلالة احصائية بين نتائج العينات البيئية و العينات السريرية المدرجة في الدراسة للميكروب الصديدي الاخضر في الطريقة المظهرية و الطريقة السريرية علي حد سواء.

و قد أوصت هذه الدراسة بالاتي:

١- ان استمرار تزايد و انتشار الميكروب الصديدي الاخضر المقاوم للفلوروكينولون و المقاومة للعديد من المضادات الحيوية من دواعي القلق البالغ التي تدعو الأطباء لتجنيب استخدام الفلوروكينولون كخط أول للعلاج من أجل المحافظة على عتادالمضادات الحيوية الفعّالة ضد الميكروب الصديدي الاخضر.

٢- وهناك حاجة في المستقبل لمزيد من المشتقات من مثبطات المضخات الطاردة من خلال دراسات موسعة للمركبات كميائيا من أجل الحد من مساوئ هذه المركبات الحالية المتعلقة باعراضه الجانبية البيولوجية.

٣- ان هناك حاجة لتقنيات أكثر تقدما لمعايرة مثبطات المضخات الطاردة ، والكشف بدقة عن المضخات الطاردة لكل المضادات الحيوية من أجل تصميم مثبطات مناسبة للمضادات الحيوية.

٤- هذه المعايير ضرورية للاختيار بين المثبطات العامة التي تثبط مضخات الطاردة المضادات الحيوية المختلفة في أحد الأنواع البكتيرية أو المثبطات المتخصصة التي تحول دون ضخ مجموعة واحدة من المضادات الحيوية في البكتيريا المختلفة.