Microbiological Study on Gatifloxacin, A Fourth Generation Fluoroquinolone, against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates

A Thesis
Presented to
Faculty of Pharmacy, Alexandria University
In fulfillment of the
Requirements for the degree

Of
Ph. D. of Pharmaceutical Sciences

In
Pharmaceutical Microbiology

By
Marwa Ahmed Atef Abd El Aziz Yakout

M. Sc. Degree in Pharm. Sci., (2011)

Faculty of Pharmacy, Alexandria University

Faculty of Pharmacy
Alexandria University

2016

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No . 179
Classification : 615.19

الملخص العربى

الهدف من هذا العمل هو دراسة نشاط الجاتيفلوكساسين المضاد للميكروبات ، هذا بجانب تقديم معلومات عن انتشار المقاومة للجاتيفلوكساسين بين عزلات السودوموناس اريجينوزا و الستافيلوكوكاس أوريس كما شعرنا أنه من المهم التحقيق في آلية المقاومة و عمل دمج بين الجاتيفلوكساسين و مضادات حيوية أخرى فى العلاج للحد من هذه المقاومة، وكذلك دراسة تأثير مابعد المضاد الحيوي للجاتيفلوكساسين لتنظيم جرعاتة بشكل افضل .

وقد تضمنت هذه الدراسة مائة و ثمانية عزلة بكتيرية (أربعة وخمسون سودوموناس اريجينوزا و أربعة وخمسون ستافيلوكوكاس أوريس) تم جمعها من مصادر مختلفة من أربعة مستشفيات رئيسية في الإسكندرية، بالإضافة إلى مختبرات خاصة بين يناير ويونيو ٢٠١٤ وتم التعرف عليها باستخدام الاختبارات الميكروسكوبية والبيوكيميائية.

و قد تم اجراء اختبار حساسية للعزلات تجاه المضادات الحيوية المختلفة باستخدام الانتشار من خلال الأجار باستخدام الأقراص. و قد لوحظ أن أعلى معدل للمقاومة بين عزلات السودوموناس اريجينوزا المختبرة (١٠٠٪) كان الأمبيسلين/سلبكتام، في حين أن أكثر من ٥٠٪ منها أظهرت مقاومة للسيفترياكسون، والسيفوبيرازون، والأوفلوكساسين. في حين أن أكثرها فعالية ضد عزلات السودوموناس اريجينوزا المختبرة كان الإميبينام وتازوباكتام / بيبيراسيلين. ومع ذلك، كانت ١٣٪ من عزلات السودوموناس اريجينوزا المختبرة مقاومة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها وبالتالى تم تصنيفها "كلية القاومة للمضادات الحيوية" PDR . بينما أظهرت عزلات الستافيلوكوكاس أوريس أعلى معدل للمقاومة (١٠٠٪) للكلوكساسيللين والفلكلوكساسيلين. بينما أظهرت ٥٠٪ من عزلات الستافيلوكوكاس أوريس مقاومة لعدد 16-20 من المضادات الحيوية المختبرة. ولذلك تم تصنيفها على أنها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية MDR. كما اظهرت ١٣٪ من عزلات الستافيلوكوكاس أوريس مقاومة لجميع المضادات الحيوية عدا الفانكومايسين والإيميبينام والسلفاميثوكسازون/ ترايميثوبريم، ولكن لم تلاحظ سلالات كلية المقاومة.

وقد تم تقييم نشاط الجاتيفلوكساسين المثبط للبكتير يا ضد عزلات السودوموناس اريجينوزا و الستافيلوكوكاس أوريس. ووجد أن أدنى تركيز له يتراوح ما بين ٠.٥-٥٠٠ ميكروجرام / مل ،٠.١٦-١٦ ميكروجرام / مل بين عزلات الستافيلوكوكاس أوريس. وذلك وفقا للمبادىء التوجيهية العالمية CLSI 2014 كان معروفا أن المقاومة البكتيرية للجاتيفلوكساسين في كثير من الأحيان تكون أقل من نظائرة من الفلوروكينولونات القديمة. لهذا السبب تم دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لبعض أفراد الفلوروكينولونات بين العزلات، ووجد أن عزلات السودوموناس اريجينوزا المختبرة أظهرت أعلى نسبة من المقاومة (٦١.١٪) للأوفلوكساسين مقارنة الجاتيفلوكساسين (٥٩.٢٪)، تليها (٥٣.٧٪) لسيبروفلوكساسين، وأقل نسبة للمقاومة كانت ضد الليفوفلوكساسين (٥١.٩٪). ومن جهة أخرى كانت السيبروفلوكساسين والأوفلوكساسين أقل نشاطا ضد عزلات الستافيلوكوكاس أوريس (٦٦.٧٪ المقاومة). والموكسيفلوكساسين والليفوفلوكساسين متساويان فى الفاعلية لوجود ارتفاعا طفيفا للنشاط ضد عزلات الستافيلوكوكاس أوريس (٦٤.٨٪ المقاومة)،بينما يبدو أن الجاتيفلوكساسين هو الأكثر نشاطا مقارنة بالفلوروكينولونات المختلفة (٤٢.٩٪ المقاومة).

وعند دراسة تأثير الجاتيفلوكساسين على تكوين الاغشية الحيوية، لوحظ أن الجاتيفلوكساسين أظهر فعالية عالية في الحد من كتلة الغشاء الحيوي المتكونة عنها في غيابه في (٨٨.٩٪) من السودوموناس اريجينوزا وفعالية معتدلة (٤٦.٤٪) من عزلات الستافيلوكوكاس أوريس.

وتمت دراسة تأثير قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة (٥، ٦، ٧، ٨) وتركيز البكتيريا بالمحلول (10^{3}، 10^{5}، 10^{7}) على نشاط الجاتيفلوكساسين. ولوحظ أن نشاط الجاتيفلوكساسين تأثر بتغيير درجة الحموضة. ولوحظ أيضا أن نشاط الجاتيفلوكساسين يعتمد على تركيز البكتيريا بالمحلول ومستوى المقاومة للعزلات المختبرة.

وقد تم تعيين تأثير مابعد المضاد الحيوي كمحاولة لتقليل الجرعات وتقليل الآثار السلبية المحتملة من الجاتيفلوكساسين. فقد تبين أن تأثير مابعد المضاد الحيوي لعزلات السودوموناس اريجينوزا تراوحت بين ١.٨ و ٢ ساعة، في حين أن عزلات الستافيلوكوكاس أوريس أظهرت تأثير مابعد المضاد الحيوي ١.٦ ساعة.

و كذلك تم عمل دمج بين الجاتيفلوكساسين والمضادات البكتيرية الأخرى فى العلاج كمحاولة للحد من مقاومة البكتيريا للجاتيفلوكساسين. ولوحظ ٦٦.٧٪ تآزر عند دمج الجاتيفلوكساسين والسيبروفلوكساسين في كل من عزلات السودوموناس اريجينوزا و الستافيلوكوكاس أوريس التي تم اختبارها.

كما أظهرت التآزر٦٦.٧٪ عندما يقترن الجاتيفلوكساسين مع أى من السيفوبيرازون أوالبنزالكونيوم كلورايد ضد عزلات السودوموناس اريجينوزا المختبرة. بينما أظهردمج كل من الجاتيفلوكساسين والبنزالكونيوم كلورايد فى عزلات الستافيلوكوكاس أوريس تآزر٪ ١٠٠.

بينما لم يظهر دمج الجاتيفلوكساسين / ديكلوفيناك و الجاتيفلوكساسين / ديكساميثازون تآزرا ضد كل العزلات المختبرة. تم أيضا تقييم مزيج الجاتيفلوكساسين / حمض الفوسيديك ضد الستافيلوكوكاس أوريس (S8) باستخدام نصف أدنى تركيز مثبط للنمو لكل من الجاتيفلوكساسين وحمض الفوسيديك ونتج عنها تأثيرا متضاداً، وبالرغم من ذلك باستخدام نصف أدنى تركيز مثبط للنمومن الجاتيفلوكساسين مع ١٠ مرات أدنى تركيز مثبط لحمض الفوسيديك تبين وجود تآزر.

ولدراسة آليات مختلفة من المقاومة ومدي مساهمة كل واحدة منهم فى المقاومة ضد الجاتيفلوكساسين، تم التعرف على مستوى الاقتران بين الستافيلوكوكاس اورياس والسودوموناس اريجينوزا. فانه لم يتبين اى اقتران عند خلط كل من الستافيلوكوكاس اورياس و السودوموناس اريجينوزا فى مزرعة واحدة.

وقد تم دراسة تحريض المقاومة الجاتيفلوكساسين عن طريق تمرير كل من العزلات فى نصف أدنى تركيز مثبط للنمو من الجاتيفلوكساسين لمدة خمسة أيام فأظهرت ٦٠% من العزلات زيادة في أدنى تركيز مثبط للنمو ٨-٣٢ مرة، وعلاوة على ذلك، فقد وجد أن ٨٩٪ ثبات فى أدنى تركيز مثبط للنمو بعد تمرير هذه العزلات لمدة خمسة ايام متتالية فى مستنبت سائل خالى من المضاد الحيوى.

وأجري تقييم نشاط المضخات الطاردة للمضادات الحيوية كآلية مقاومة ضد الجاتيفلوكساسين باستخدام الإثيديوم بروميد كمثال فى كل من السودوموناس اريجينوزا والستافيلوكوكاس اورياس حيث أشارت النتائج إلى إمكانية مساهمة نشاط المضخة بالنسبة لعزلات الستافيلوكوكاس اورياس فى المقاومة ضد الجاتيفلوكساسين ولكن من ناحية أخرى لم يتبين إمكانية مساهمة نشاط المضخة بالنسبة لعزلات السودوموناس اريجينوزا فى المقاومة ضد الجاتيفلوكساسين.

الآلية الرئيسية التي تساهم في المقاومة ضد الفلوروكينولونات هي طفرات في الجينات التي تكود DNA gyrase وIV topoisomerase ولذلك تم دراسة علاقة الطفرات في الجينات التى ترمز DNA gyrase وIV topoisomerase مع المقاومة الجاتيفلوكساسين عن طريق دراسة تتابع الجينات في الـ QRDRs لـ *gyrA* و*parC* في السودوموناس اريجينوزا ، وكذلك لل *grlA* و*gyrA* في الستافيلوكوكاس اورياس. وأظهرت نتائج التتابع لجين *grlA* ، أن كلا من العزلات (المقاومة أو المستحثة المقاومة) أظهرت طفرة C2614T، نتج عنها استبدال S80F في جينات ال*grlA*. وقد لوحظ A2860C طفرة إضافية في العزلة المستحثة المقاومة مما أدى إلى N162T في جينات ال*grlA*. وعلاوة على ذلك، أظهرت نتائج الستافيلوكوكاس اورياس لجين الـ *gyrA* ، أن كلا من العزلات أظهرت طفرة C2402T، نتج عنها استبدال S84L في جين *gyrA* وطفرة T2409C، مما أدى إلى طفرة صامتة في I86 لجين *gyrA* ، وطفرة فى G2529A، مما أدى إلى طفرة صامتة في A126 في جين *gyrA* وكما أظهرت عينة الستافيلوكوكاس اورياس المقاومة للجاتيفلوكساسين طفرة إضافية G2205C مما أدى إلى استبدال M18I في جين *gyrA*. ومن ناحية أخرى، أظهر تسلسل الجين *gyrA* فى السودوموناس اريجينوزا المعزولة طفرة نقطة في C248T، نتج عنها استبدال T83I. وتسلسل جين *parC* فى السودوموناس اريجينوزا المعزولة أظهر طفرة واحدة فقط صامتة T260C في العينة المقاومة فقط ولم يسفر عنه إحلال leucin.

من المعلومات التى تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة، يمكن الوصول للاستنتاجات التالية:

- يمتلك الجاتيفلوكساسين نشاطا كبيرا مثبطاً وقاتلا للميكروبات ضد مجموعة متنوعة من السودوموناس اريجينوزا والستافيلوكوكاس اورياس.
- دمج الجاتيفلوكساسين مع المضادات البكتيرية الأخرى يساعد على تقليل ظهور المقاومة أثناء العلاج مع تآزر التفاعل.

- يمكن تفسير ظهور المقاومة للجاتيفلوكساسين باستخدام الفلوروكينولونات لفترة طويلة بإعتبار انه يصرف بدون روشتة .
- الطفرات يمكن اكتشافها بطريقة سريعة و معتمدة عن طريق دراسة تسلسل الحمض النووي.

من النتائج السابقة، يمكن اقتراح التوصيات الآتية:-

- ينبغى ان لا يساء استخدام الجاتيفلوكساسين لتجنب المشكلة العالمية لمقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية.
- ينبغى دمج الجاتيفلوكساسين مع المضادات البكتيرية الأخرى فى العلاج.
- هناك حاجة الى مزيد من الدراسات للكشف عن آليات أخرى لمقاومة الميكروبات للجاتيفلوكساسين.
- هناك حاجة الى دراسات متعمقة عن معدل وتكرار المقاومة للجاتيفلوكساسين فى الجسم الحى.