771
E15
c19

Tanta University
Faculty of Pharmacy
Pharmaceutical Microbiology Department

Molecular Characterization of the Prevalent Pathogenic Bacteria Recovered From Children With Otitis Media

Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Master of Pharmacy
"Pharmaceutical Microbiology"

By
Hebatallah Osama Ellabody
B.Sc of pharmaceutical sciences,
Faculty of Pharmacy, Pharos university, 2012

Under supervision of

Dr. Tarek El-Said El-Banna
Professor of Pharmaceutical Microbiology
Faculty of Pharmacy
Tanta University

Dr. Fatma Ibrahim Sonbol
Professor of Pharmaceutical Microbiology
Faculty of Pharmacy
Tanta University

Dr. Abeer Ghazal
Professor and Head of Microbiology Department
Medical Research Institute
Alexandria University

Faculty of Pharmacy
2020

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 771
Classification : 616

Abstract

Keywords: *P. aeruginosa, S. aureus,* MRSA, β-lactamase, virulence factors, Carbapenemases, Metallo-β-lactamases

A total of 188 isolates were recovered from 180 pediatrics suffering from OM and admitted to Alexandria hospitals. These isolates included 134 (71.3%) Gram-negative and 54 (28.7%) Gram-positive bacteria. All these isolates were biochemically identified, and the confirmation of identity among Gram-negative isolates using MALDI-TOF MS technique revealed the presence of 18 different bacterial species. Among the isolated Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* was the predominant (20.2%, n=38) identified species, while *S. aureus* was the predominant isolated Gram-positive bacterial species (19.1%, n=36).

Susceptibility testing was performed on the recovered *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates using Kirby-Bauer disc diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations. Among *S. aureus* isolates, penicillin showed the highest (91.7%) antibacterial resistance, followed by kanamycin (75%) and tobramycin (52.8%). On the other hand, 100% and 94.4% of the tested *S. aureus* isolates were susceptible to linezolid and chloramphenicol, respectively.

Based on the resistance patterns of *S. aureus* isolates, 27 (75%) out of the tested isolates exhibited high (> 0.2) multiple antibiotic resistance index values indicating high antibiotic misuse.

Among *P. aeruginosa* isolates, it was found that all the tested isolates showed resistance to ampicillin, amoxicillin, cefazolin, cefaclor, cefoxitin and Sulphamethoxazole/Trimethoprim. Moreover, high percentage of resistance

was noticed in chloramphenicol, ceftriaxone, azithromycin and cefotaxime (94.7%, 89.5%, 84.2% and 86.8%, respectively). In contrast, all *P. aeruginosa* isolates were sensitive to colistin and polymyxin. The MAR index values in *P. aeruginosa* showed that 86.8% isolates had MAR index greater than 0.2.

Minimum inhibitory concentration of cefoxitin among recovered *S. aureus* isolates was determined using broth microdilution method in order to determine MRSA isolates. It was found that 20 *S. aureus* isolates were methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) with MIC <8 µg/ml. On the other hand, MRSA isolates with MIC values ranging from 8 to 256 µg/ml were determined in 44.4% of recovered *S. aureus* isolates. Genotypic detection of *mec*A and *fem*A genes among *S. aureus* isolates was carried out using polymerase chain reaction, where all *S. aureus* isolates with MIC >8 µg/ml harbored these genes and only one methicillin sensitive *S. aureus* isolate with MIC <8 µg/ml was found to harbor *mec*A gene.

All *P. aeruginosa* isolates were screened for the production of β-lactamase enzymes using iodometric overlay method. Where, 92.1% of *P. aeruginosa* isolates produced β-lactamase enzymes. Moreover, ESBL production was determined using modified double disc synergy test and combined disc test, where 74.3% of β-Lactamases producing *P. aeruginosa* isolates were ESBL producers. Carbapenemases detection was performed using modified Hodge test (MHT) which revealed that none of the tested isolates was MHT positive. While, detection of metallo-β-lactamases was performed by Ethylenediaminetetraacetic acid synergistic test using imipenem discs alone and in combination with EDTA and it was found that 17.1% of β-Lactamases producing *P. aeruginosa* isolates were metallo-β-lactamases producers.

Genotypic detection of aminoglycosides resistance among *S. aureus* isolates was carried out by amplification of genes encoding aminoglycosides modifying enzymes (AMEs) using PCR. The *aac (6')Ie/aph(2'')Ia* gene was the predominant gene as it was detected in 38.9% of the tested *S. aureus* isolates followed by *aph(3')-IIIa* and *ant (4')-Ia* which were detected in 36.1% and 30.6% of *S. aureus* isolates, respectively.

All *S. aureus* isolates were screened for the presence of certain virulence factors by the detection of *cap*8, *cap*5 and *lukS/F-PV* virulence genes using Polymerase Chain Reaction technique. It was found that *cap*8, *cap*5 and *lukS/F-PV* were detected in 33.3%, 25% and 11.1% of *S. aureus* isolates, respectively.
Genotypic detection of extended spectrum β-lactamases genes among tested *P. aeruginosa* isolates revealed that *tem* and *oxa*-48 genes were detected in 31.6% and 18.4% of *P. aeruginosa* isolates, respectively. While none of tested *P. aeruginosa* isolates harbored *vim*-2 gene. Concerning virulence genes among *P. aeruginosa,* It was found that, *toxA, aprA* and *phzS* showed higher prevalence in 78.9%, 73.7% and 71%, of *P. aeruginosa* isolates, respectively followed by *phz*M (68.4%), *alg*D (68.4%) and *exo*S (60.5%).

الملخص العربي

يعتبر إلتهاب الأذن الوسطى من الأسباب الرئيسية عالميا التي تستدعي زيارة أطباء متخصصين و هو عبارة عن تجمع سائل معدي يؤدي إلى ألام شديدة و إنسداد في طبلة الأذن ، وفي حالة حدوث ثقب فيها يحدث تجمع لهذا السائل في قناة الأذن. إلتهاب الأذن الوسطى يعتبر مرض متعدد الاسباب ومرتبط بالعديد من عوامل الخطورة، بما في ذلك الإلتهابات البكتيرية والفيروسية التي تعتبر أهم أسباب حدوث هذا المرض حيث تعتبر العدوى السريرية التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية هي العدوي الشائعة والأكثر خطورة. وعليه فقد زادت مقاومة البكتريا للمضادات الميكروبية وكذلك مدى انتشار الأمراض المرتبطة بها. و من الواضح أن القدرة الإمراضية لكل من الزائفة الزنجارية و المكورات العنقودية الذهبية متعددة الاسباب لما تحتويه من عوامل الشراسة المرتبطة بحدة المرض.

يهدف هذا البحث إلى تحديد مدى انتشار البكتيريا في العينات المسحوبة من الأطفال المصابين بالتهاب الأذن الوسطى في المستشفيات الجامعية في مدينة الإسكندرية. بالإضافة إلى تحديد وتوصيف حدة البكتيريا ونمط المقاومة لعزل كل من المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية.

تم عزل ١٨٨ عزلة من١٨٠طفل يعاني من التهاب الأذن الوسطى في المستشفيات الجامعية بالأسكندرية. من بين هذه العزلات البكتيرية كانت ١٣٤ عزلة سالبة الجرام و ٥٤ عزلة موجبة الجرام. تم التعرف على جميع العزلات باستخدام الاختبارات البيوكيميائية و تم تأكيد وجود هذه البكتريا باستخدام تقنية MALDI-TOF MS التي أظهرت وجود ١٨ نوعا مختلفا من البكتيريا. كانت البكتيريا المعزولة السائدة هي الزائفة الزنجارية بنسبة ٢٠,٢% و المكورات العنقودية الذهبية بنسبة ١٩,١%. تم اختبار حساسية المضادات الميكروبية لعدد ٣٨ عزلة من الزائفة الزنجارية و ٣٦ عزلة من المكورات العنقودية الذهبية بناء على توصيات معهد المعايير السريرية والمخبرية (CLSI). لقد أظهرت عزلات المكورات العنقودية الذهبية أعلى مقاومة لعقار البنيسلين بنسبة ٩١,٧٪. علاوة على ذلك، أظهر عقار الجينتاميسن والأميكاسين والكاناميسن والتوبراميسن مقاومة ضد العزلات بنسبة تتراوح بين ٤١,٧٪ و ٨٠,٦٪. بينما أظهرت العزلات معدلات حساسية عالية ضد كل من عقاري اللينزوليد والكلورامفينيكول بنسبة ١٠٠٪ و٩٤,٤٪ على التوالي. بناءا علي أنماط مقاومة عزلات المكورات العنقودية الذهبية، أوضحت النتائج أن ٧٥٪ من العزلات المختبرة لديها قيم عالية (أكثر من ٠,٢) من مؤشر مقاومة المضادات الحيوية المتعددة (MAR index). و قد أظهرت النتائج ان ١٦ عزلة كانت مقاومة للميثيسيلين (٤٤,٤٪) من بين ٣٦ عزلة مختبرة من المكورات العنقودية الذهبية عن طريق تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC) من سيفوكسيتين باستخدام إحدى طرق التخفيف الدقيق ونمو

المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين على أوساط زرع البكتيريا المولدة للصباغ (Chromogenic agar media).

و لقد كشف اختبار الحساسية للمضادات الميكروبية في عزلات الزائفة الزنجارية أن ٨٦,٨٪من العزلات لديها مؤشر مقاومة المضادات الميكروبية المتعددة بقيمة أعلى من ٠,٢. و لوحظت أعلى نسبة مقاومة بين هذه العزلات في الكلورامفينيكول (٩٤,٧٪)، يليها سيفترياكسون (٨٩,٥٪)، وسيفوتاكسيم (٨٦٪)، وأزيثروميسين (٨٤,٢٪). بينما ١٣,٢٪من عزلات الزائفة الزنجارية كانت مقاومة للأمييبينيم.

و قد تم عمل فحص لإنتاج إنزيمات بيتا لاكتاميزيز لعزلات الزائفة الزنجارية باستخدام طريقة التراكب اليودومتري التي أوضحت أن ٩٢,١٪ من العزلات منتجة لهذا الإنزيم. تم الكشف عن النمط الظاهري لإنزيمات البيتا لاكتاميزيز واسعة المدى بين عزلات الزائفة الزنجارية بواسطة كل من اختبار التآزر مزدوج القرص المعدل واختبار القرص المشترك باستخدام عقاري السيفتازيديم و السيفوتاكسيم كل على حده وأيضا عن طريق إضافة حمض الكلافولانيك لكل منهم. أظهرت النتائج أن ٢٦ من أصل ٣٥ عزلة للزائفة الزنجارية منتجة لهذا الإنزيم.

و في هذا البحث تم ايضا الكشف عن النمط الظاهري لإنزيم الكاربابينيميز باستخدام طريقة هودج المعدلة التي أظهرت نتائج سلبية لجميع عزلات الزائفة الزنجارية. و بالكشف عنه بواسطة اختبار EDTA التآزري باستخدام عقار الإمييبينيم بمفرده ومجتمعا مع ال EDTA. أظهرت النتائج وجود ٦ عزلات ايجابية للزائفة الزنجارية لهذا الإختبار. تم تأكيد المقاومة للميثيسلين في عزلات المكورات العنقودية الذهبية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل من خلال الكشف عن جينات *mecA* و*femA* و قد كشف هذا التفاعل عن وجود الجين *mecA* في ١٧ عزلة بينما تم الكشف عن عزلة واحدة بها جين *mecA* من بين هذه العزلات التي كان التركيز الأدنى المثبط لها اقل من ٨ ميكروجرام/ مل. تم الكشف عن الأنماط الجينية لمقاومة الأمينوجليكوسيدات عن طريق تكثيف الجينات التي ترمز إلى الإنزيمات المعدلة للأمينوجليكوسيدات باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل. كان الجين *aac (6')Ie/aph(2")Ia* هو الجين الأكثر شيوعًا حيث تم اكتشافه في ١٤ عزلة (٣٨,٩٪) من العزلات المختبرة يليه *aph (3')-IIIa* في ١٣ عزلة (٣٦,١٪) و *ant (4')-Ia* في ١١ عزلة (٣٠,٦٪) من أصل ٣٦ عزلة مختبرة.

تم عمل مسح لجميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية للكشف عن وجود الجينات *cap8* و*cap5* و *lukS/F-PV* المسئولة عن شراسة البكتيريا باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل. حيث تم الكشف عن وجود *cap8* و*cap5* و*lukS/F-PV* في ٣٣,٣٪ و٢٥٪ و ١١,١٪ على التوالي في هذه العزلات. فيما يتعلق بجينات شراسة البكتيريا الخاصة بالزائفة الزنجارية، فقد وجد أن *toxA* و*aprA* و*phzS* هي

الأعلى انتشارا بنسبة ٧٨,٩٪ و٧٣,٧٪ و ٧١٪ على التوالي ، يليها كل من *phzM* و*algD* و*exoS* التي وجدت بنسبة ٦٨,٤٪ و٦٨,٤٪ و٦٠,٥٪على التوالي في عزلات هذه البكتيريا.

و في الختام ، أوضحت هذه الدراسة أن المكورات العنقودية الذهبية وخاصة المكورات العنقودية المقاومة للميثيسيلين و الزائفة الزنجارية، هي العوامل الرئيسية المسببة لإلتهاب الأذن الوسطى في مستشفيات الإسكندرية. بالإضافة إلى الجينات المقاومة للمضادات الحيوية ، فإن هذه العزلات تحتوي على الجينات المسئولة عن شراسة البكتيريا مع انتشار جينات *toxA* و *aprA* و *phzS* بين عزلات الزائفة الزنجارية. بينما كان *cap8* و*cap5* سائدًا بين عزلات المكورات العنقودية الذهبية.

وقد لوحظ عدم وجود ارتباط محدد بين نمط المقاومة لعزلات المكورات العنقودية الذهبية ونمط وجود جينات المقاومة أو الجينات المسؤولة عن شراسة هذه البكتريا، حيث كانت العزلات التي لها نفس نمط المقاومة تحتوي على انواع مختلفة من الجينات المقاومة او الجينات المسؤولة عن الشراسة.

وبخصوص عزلات الزائفة الزنجارية فقد وجدت عوامل الشراسة المختبرة بنسبة أكبر فى العزلات التى لم تظهر مقاومة متعددة (MDR) او ممتدة (XDR) للمضادات الميكروبية بالمقارنة بالعزلات التي ذات المقاومة متعددة او الممتدة للمضادات الميكروبية، باستثناء جين *toxA* الذي اظهر نسبة اعلي بين العزلات متعددة المقاومة و العزلات ممتدة المقاومة للمضادات الميكروبية.

و بناءا علي نتائج هذا البحث نوصي بالاتي:

- ضرورة المراقبة المستمرة والتحكم في مقاومة مضادات الميكروبات و حدة البكتيريا في عزلات المكورات العنقودية الذهبية و الزائفة الزنجارية باعتبارها من المسببات الرئيسية لالتهاب الأذن الوسطى عند الأطفال في مدينة الإسكندرية.
- يجب ترشيد استخدام المضادات الميكروبية لتقليل انتشار السلالات المقاومة للأدوية المتعددة.
- ضرورة الاستفادة من تطبيق برنامج الإشراف على مضادات الميكروبات (Antimicrobial stewardship program) في المستشفيات المصرية لتحسين و تعظيم الاستفادة من استخدام مضادات الميكروبات الموجودة وتقليل وجود طفرات تؤدي الي انتشار السلالات المقاومة.
- يلزم إجراء مزيد من الابحاث لتطوير مضادات جديدة للميكروبات و/أو عوامل مضادة لشراسة البكتريا حتي يتثنى مكافحة هذه الإشكالية بين البكتريا المسببة للأمراض المعدية.