# Molecular Study of Co-Resistance to Fluoroquinolones and Aminoglycosides among *Escherichia coli* Clinical Isolates

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

Of

**Master of Pharmaceutical Sciences**

In

**PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY**

By


***Ghada Hani Ali Nassef***

B. Pharm. Sci. 2005
Faculty of Pharmacy, Alexandria University



Pharmacy
G-114
593


**Faculty of Pharmacy**
**Alexandria University**
**2011**

# الملخص العربي

تعتبر مقاومة البكتيريا اي كولاى للمضادات الحيوية من المشكلات الرئيسية الواسعة الانتشار في جميع انحاء العالم، و يختلف معدل الأصابة بهذه البكتيريا باختلاف المنطقة الجغرافية و كذلك السكان و البيئات المختلفة. و قد احدثت المقاومة الناشئة للفلوروكينولون و الامينوجليكوزيدات و المنتشرة في سلالات اي كولاي متعددة المقاومة للمضادات الحيوية قلقا متزايدا استمر على مدى العقد الماضي و ذلك لقلة الخيارات العلاجية المتاحة ضد هذه السلالات. ومن ثم، فان استعمال المضادات الحيوية بكثافة كان له تأثير واضح و فعال في انتشار هذه المقاومة للمضادات الحيوية في البكتيريا المسببة للعدوى.

وقد تم مؤخرا تحديد البروتين المسؤول عن مقاومة الفلوروكينولون و المرتبط بالبلازميد فى بكتيريا اي كولاى التى تم عزلها من العينات الاكلينيكية في اليابان، ايضا تم اكتشاف وجود هذا البروتين في بكتيريا اي كولاى المعزولة في بلجيكا.

ويعتبر انتاج الانزيمات المضادة والمعدلة للامينوجليكوزيدات من أحد الطرق الأكثر شيوعا والتي تنتهجها البكتيريا لتكتسب مقاومة للامينوجليكوزيدات. وقد وجد أن اضافة مجموعة الميثيل الى 16S الموجودة بالحامض النووي الريبوزي الريبوسومي بواسطة انزيمات الميثيليز الخاصة بهذا الغرض يعد الية من اليات الدفاع التي تقوم بها البكتيريا المنتجة للامينوجليكوزيدات.

وقد تم مؤخرا الكشف عن مجموعة من الجينات الخاصة بانتاج انزيمات الميثيليز (*arm, rmt*) فى العزلات السريرية للبكتيريا السالبة الجرام. وقد وجد ان هذه الانزيمات تمنح السلالات البكتيرية المنتجة لها مقاومة عالية لمعظم الامينوجلوكوزيدات ذات الاهمية من الناحية الاكلينيكية و مثال ذلك عقار الاميكاسين و الكناميسين و غيرها.

وفى دراسات سابقة وجد ان الشفرة الخاصة بالجين الخاص بالمقاومة للكينولون (*qepA*) كذلك بالجين الخاص بالمقاومة للامينوجلوكوزيدات (*rmtB*) محمولة على نفس البلازميد فى بكتيريا اي كولاى مما قد يتسبب في ظهور تقنية جزيئية حديثة مسؤولة عن المقاومة العالية و المنتشرة ضد العديد من الامينوجلوكوزيدات كذلك الكينولون فى البكتيريا السالبة الجرام و التى قد تساهم انتشارها على مستوى العالم فى حدوث مشكلة كبيرة ذات اثر واضح على الصحة العامة.

ومن هنا كان هدف البحث الدراسة الجزيئية للمقاومة المشتركة للفلوروكينولون و الامينوجلوكوزيدات بين عزلات اي كولاى الاكلينيكية.

تم عزل ٢٢٥ عزلة اي كولاى من المرضى المترددين على كل من معهد البحوث الطبية و مستشفى جامعة الاسكندرية في الفترة مابين نوفمبر ٢٠٠٨ و اكتوبر ٢٠٠٩ . وقد تم اختبار هذه العزلات بالطرق التقليدية للتاكد منها، ايضا تم اختبارها لمدى حساسيتها للمضادات الحيوية و التى تشمل الكينولون (حمض الناليديكسيك- سيبروفلوكساسين-ليفوفلوكساسين-نورفلوكساسين) كذلك الامينوجلوكوزيدات (اميكاسين- جينتاميسين- نيومايسين- توبراميسين) بطريقة الانتشار القرصى( Kirby-Bauer) على اجار Mueller Hinton كذلك تم اختبار حساسية هذه العزلات لعدد من المضادات الحيوية الاخرى و التى تشمل ايميبينيم- تتراسيكلين- سيفترياكزون و ترای ميسوبريم- سالفاميسوكزازول. و تم فصل عزلات اي كولاى ذات المقاومة المشتركة لكل من الامينوجلوكوزيدات و الكينولون و حفظها فى وسط LB glycerol broth و تخزينها عند درجة 20°C- لحين فحصها لوجود كل من جين *qepA* المسؤول عن المقاومة للكينولون وكذلك *rmtB* المسؤول عن المقاومة للامينوجلوكوزيدات بالاضافة الى الاختبارات الاخرى.

وجد أن ٤٥ عزلة لبكتيريا اي كولاي قد أظهرت مقاومة مشتركة لكل من الكينولون والامينوجليكوزيدات عند فحصها بطريقة الانتشار القرصي وتم فحص العزلات بواسطة تقنية سلسلة تفاعل البوليميريز لوجود كل من جين *qepA* و *rmtB*. وعند فحص هذه العزلات الاكلينيكية (٤٥) للكشف عن وجود *rmtB* المسؤول عن مقاومة

الامينوجليكوزيدات ، وجدت ثلاث عزلات من أصل ٤٥ عزلة اكلينيكية ايجابية لوجود جين *rmtB*. أيضا، وجدت عزلتان من أصل ٤٥ عزلة اكلينيكية ايجابية لوجود جين *qepA*. وقد أسفرت النتائج عن عدم وجود ارتباط بين كلا الجينين في نفس العينة حيث أنه قد وجد أن العزلات الحاملة لجين *qepA* كانت غير حاملة للجين *rmtB* والعكس.

استخدمت طريقة التخفيف فى السائل لتعيين التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا الخاص بعقار السيبروفلوكساسين و الجينتاميسين تجاه العترات المختبرة و التى اثبتت ان هناك درجات و نسب مختلفة للمقاومة، فقد تراوح التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا الخاص بعقار السيبروفلوكساسين من ٣١.٢٥ الى ١٠٠٠< ميكروجرام/ مل والخاص بعقار الجينتاميسين من ٦٢.٥ الى ١٠٠٠< ميكروجرام/ مل.اما التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا الخاص بعقار الليفوفلوكساسين تجاه العترات المختارة تراوح من ٦٢.٥ الى ٢٥٠ ميكروجرام/ مل.

تم اختبار تأثير المثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية Phenylarginine-beta-naphthylamide (PAβN) في ثلاثة تركيزات مختلفة على نسب التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا لكل من عقار الجينتاميسين (كمثال للامينوجليكوزيدات) و السيبروفلوكساسين و الليفوفلوكساسين (كمثالين للفلوروكينولون) و المختبرة على عينات اي كولاي المنتقاة (ثلاث عينات حاملة للجين *rmtB* وهم E21, E29, E30 ، وعينتان حاملتان للجين *qepA* وهما E27,E43. اضافة الى ثلاث عزلات أظهرت مقاومة عالية مشتركة لكل من الجينتاميسين و السيبروفلوكساسين دون وجود كلا الجينين (*rmtB*،*qepA*).وقد أظهر هذا الاختبار أنه بزيادة تركيز PAβN كان هناك تناقص مقابل في نسبة التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا للسيبروفلوكساسين و الليفوفلوكساسين بعد اضافة ٢٥، ٥٠ و ١٠٠ ميكروجرام/ مل بمدى من ٢ الى ١٢٨ ضعف للسيبروفلوكساسين ومن ٤ الى ٦٤ ضعف لليفوفلوكساسين لجميع العزلات المختبرة. بينما لم يكن هناك اى تاثير واضح من المثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية على التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا لعقار الجنتاميسين فى العترات المنتقاة فيما عدا عزلة واحدة كذلك العينة الضابطة المرجعية.

باجراء تجربة التخفيف فى السائل باستخدام نظام الرقعة الشطرنجية لدراسة تأثير خليط من السيبروفلوكساسين و الجينتاميسين على العزلات البكتيرية الحاملة لكل من جيني *qepA* و*rmtB* (خمس عزلات) من بكتيريا اي كولاي وحساب التركيز الجزئى المثبط لنمو البكتيريا، وجد أنه عند تعرض هذه العزلات البكتيرية للمضادين الحيويين مجتمعين (سيبروفلوكساسين و جينتاميسين)، فإن المقاومة المتولدة تجاه أحدهما تزيد من مستوى المقاومة المتولدة تجاه العقار الاخر والذي لوحظ في ارتفاع معدل التركيز الادنى المثبط لنمو البكتيريا.

مما سبق نستخلص ما يلي:

- بالرغم من وجود هذه السلالات الحاملة لهذه الجينات و الخاصة بالمقاومة ضد الفلوروكينولون و الامينوجلوكوزيدات بنسب غير مرتفعة الا انها تنذر بمشكلة خطيرة قد تهدد الصحة العامة حيث انها قد تمثل بؤرة لانتشار هذه العزلات فى المستشفيات من المرضى و من ثم فانه يتعين على العاملين بالحقل الطبى ضرورة مراقبة و تحسين وسائل السيطرة على العدوى فى المستشفيات.
- الحد من استخدام المضادات الحيوية بطريقة عشوائية حيث انها قد تزيد من انتشار هذه العزلات المقاومة للمضادات الحيوية.
- النتائج الواعدة و الملحوظة 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 و لكن هذه المثبط لعمل المضخات الطاردة للمضادات الحيوية قد يحتاج لتقييم اثره الصحى حتى تكون الاستفادة منه بالغة.