Alexandria University
Medical Research Institute
Department of Microbiology

THE EFFECT OF AZITHROMYCIN ON QUORUM SENSING SYSTEM AND VIRULENCE FACTORS IN CLINICAL ISOLATES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Thesis Submitted to Department of Microbiology
Medical Research Institute- Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the degree of

Ph.D

In

Diagnostic and Molecular Microbiology

By

Ingy Ibrahim Mahmmoud Mahmmoud Abd-Allah El-Soudany
B.Sc. of Pharmaceutical Sciences, 2008
M.Sc. in Diagnostic and Molecular Microbiology, 2012
Alexandria University

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D M
Serial No : 185
Classification : 616.01

Medical Research Institute
Alexandria University

2016

الملخص العربي

يعتبر الميكروب الصديدي الأخضر من مسببات الأمراض الأنتهازية و هو من أكثر أنواع بكتريا جرام السالبة المتسببة في عدوي المستشفيات كما أنه يتصف بدرجة إمراضية عالية و المصاحب لها الكثير من عوامل الضراوة و هي إحدي أسباب نجاح هذا الميكروب كمسبب للامراض الانتهازية.

إستشعار النصاب هو آلية تستطيع بها البكتريا أن تنتج جزيئات صغيرة مثل جزيئات acyl homoserine lactones في حالة الميكروب الصديدي الاخضر وهذه الجزيئات سهلة الأنتشار و يمكن للميكروبات المحيطة التعرف عليها و يمكن لهذه الآلية أن تمكن البكتريا من التعامل كمجموعة كاملة من حيث تنظيم التعبير الجينيما يمكن البكتريا من التغلب علي مقاومة العائل لها لذلك فإن هذه الآلية مهمة لقوة الميكروب علي إحداث المرض و لذلك فإن هذه الآلية تعتبر هدف مثالي مضاد لضراوة البكتريا.

يتصف الميكروب الصديدي الأخضر بدرجة عالية من المقاومة الذاتية لمجموعة متنوعة من المضادات الحيوية مما يجعل عدد محدود من المضادات الحيوية فعّالة ضده و بالإضافة فإن هذا الميكروب يكتسب العديد من آليات المقاومة لجميع المضادات الحيوية الفعالة ضده و ينظم الميكروب الصديدي الأخضر هذه الآليات مما يجعل هذا المكروب من أكبرالتحديات العلاجية .

تُعد المضخات الطاردة من إحدي الآليات المختلفة للميكروب الصديدي الأخضر لمقاومة المضادات الحيوية. هذه المضخات هي مضخات Mex و هي من عائلة RND. هناك أدلة تراكمية أن هذه المضخات التي تتسبب في مقاومة المضادات الحيوية أنها أيضا مهمة للمكروب ليصبح إمراضي. بالأضافة إلي طرد هذه المضحات للمضادات الحيوية فهي أيضا تطرد محددات الإمراض مثل المُلصقات و السموم و البروتينات الأخري المهمة للإستيطان و عدوي خلايا الإنسان و الحيوان. الجدير بالذكر أن الجزيئات اللإشارية AHLs المسؤلة عن إستشعار النصاب تعتبر من ركائز المضخة MexAB–OprM .

هناك الكثير من الأبحاث التي تهتم بالأستهداف العلاجي للميكروب الصديدي الأخضر بآليات بديلة للمضادات الحيوية التقليدية. العلاج الذي يستهدف و يثبط إستشعار النصاب في الميكروب الصديدي الأخضر قد يؤدي إلي إضعاف ضراوة هذا الميكروب و بالتالي تساعد بقوة جهاز المناعة في التخلص من العدوي.

التأثير العلاجي لعقار الأزيثرومايسن كمضاد حيوي يكون غالباً بسبب إضعافه لقدرة الميكروب علي النمو و لكن في حالة الميكروب الصديدي الأخضر فإن تأثيره لا يُنسب لهذا حصرياً فالماكروليدات مثل الأزيثرومايسن ليست مبيدة ولا كابحة للميكروب الصديدي الأخضر في التركيز السريري ولذلك فإنه من غير المرجح أن يساعد في انتخاب السلالات المقاومة للمضادات الحيوية و مع ذلك يقوم الأزيثرومايسن بتثبيط إستشعار النصاب في هذه التركيزات في المختبر. ويعتبرالمركب phenylalanine arginyl β-naphthylamide (PAβN) من أكثر المركبات استخداماً كمثبطات للمضخات Mex في الميكروب الصديدي الأخضر.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد و دراسة تأثير الأزيثرومايسن علي جهاز إستشعار النصاب و عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب في عزلات سريرية مختلفة للميكروب الصديدي الأخضر لذلك تم التحقق من انتاج C_4HSL و قياس أربعة من عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب (إنتاج البايوسيانين ، الرامنوليبيد، البروتيازو البايوفيلم) في غياب ووجود الأزيثروميسن و كما تم إضافة نقطة بحث أخري ألا و هي التحقق من تأثير مثبط المضخات الطارد PAβN علي انتاج C_4HSL و نفس عوامل الضراوة الأربعة المعتمدة علي إستشعار النصاب وتم مقارنة نتائج تأثير المثبط بنتائج تأثير الأزيثرومايسن.

في هذه الدراسة تم جمع ٥٠ عينة سريرية من الميكروب الصديدي من قسم الميكروبيولوجي بمعهد البحوث الطبية جامعة الاسكندرية و قد تم عزلهم من عينات سريرية مختلفة مثل البُصاق ،سائل غسيل الشُعب الرئوي، أنابيب القصبة الهوائية و مسحات من جروح مُصابة و عينات بول. و قد تم التعرف علي المكروب الصديدي الأخضر باستخدام الأختبارات البيوكميائية العيارية و تم التأكد من ذلك باستخدام مطياف الكتلة MALDI-TOF. وتم حفظ العزلات في-٨٠ درجة منوية في Luria broth (LB) به ١٠% جلسرين حتي بدء الاختبارات.

تمت الاختبارات الآتية علي كل العزلات:

١- اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية الآتية باستخدام طريقة باور و كيربي : جنتاميسين، أميكاسين، سفتازدين، اميبينم، ليفوفلوكساسين، سيبروفلوكساسين بالإضافة إلي الأزيثرومايسن.

٢- تحديد التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن باستخدام اختبار microdilution.

٣- الكشف الظاهري عن جزيئات جهاز إستشعار النصاب باستخدام أختبارالفحص الحيوي Micro-AHL Cross-feeding.

٤- الكشف الظاهري عن عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب

أ- إنتاج البايوسيانين

ب- إنتاج البروتياز

ت- إنتاج الرامنوليبد

ث- تحديد كثافة تكوين البايوفيلم

تم أختبار العزلات لانتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب في غياب ووجود كل من التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن و ٢٠ ميكروجرام / مل من مثبط المضخات الطاردة **PAβN**

٥- الكشف عن جينات إستشعار النصاب ***(lasR, lasI, rhlR and rhlI)*** بأستخدام **PCR**

٦- العزلات التي كانت إيجابية جينياً و معيبة ظاهرياً خضعت جيناتها ***lasR, lasI, rhlR and rhlI*** لتحليل التسلسل الجيني للكشف عن وجود طفرات بهذه الجينات.

<u>وهذه الدراسة توصلت إلي الآتي:</u>

١- العزلات المجمعة من عينات سريرية مختلفة كانت علي النحو التالي عينات بول (٤٢%) مسحات (٤٦%)، عينات تنفسية (١٢%)

٢- ١٤ (٢٨%) من العزلات فشلت في انتاج جزيئات إستشعار النصابC_4-HSL

٣- عند تعيين إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب وُجد أن ٨٠% من عزلات الميكروب الصديدي الأخضر كانت إجابية لإنتاج البايوسيانين و ٦٤% من العزلات كانت إجابية لإنتاج الرامنوليبد و٨٢% من العزلات كانت إجابية لإنتاج البروتياز و بالنسبة لإنتاج البايويلم فقد أنتجته ٩٠% من العزلات و ١٠% تكاد تكن لم تنتجه.

٤- لقد كان هناك دلالة إحصائية بين إنتاج الجزيئات الإشارية لإستشعار النصاب C_4HSL و إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب؛ حيث كانت العزلات ال ٣٦ المنتجة للجزيئات الإشارية لإستشعار النصاب C_4HSL نسبة إنتاجها عالية لكل من البايوسيانين ، الرامنوليبد، البروتياز (بنسب ٨٨.٩% و ٨٣.٣% و ١٠٠% علي التوالي). و قد أنتفي وجود ترابط إحصائي بين انتاج الجزيئات الإشارية لإستشعار النصاب C_4HSL و إنتاج البايوفيلم.

٥- و كان هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين نسبة إيجابية إنتاج الجزيئات الإشارية لإستشعار النصاب C_4HSL و وجود جينات إستشعار النصاب الأربعة (FEp <0.001) فالعزلات ال ٣٦ المنتجة للجزيئات الإشارية لإستشعار النصابC_4HSL كانت إجابية لجينات إستشعار النصاب الأربعة.

٦- كان هناك ست عزلات إجابية لجينات إستشعار النصاب الأربعة و في نفس الوقت كانت معيبة في إنتاج معظم عوامل الضراوة لذلك خضع ناتج ال PCR لجينات إستشعار النصاب في هذه العزلات لتحليل التسلسل الجيني لهم وقد أظهر ذلك التحليل و جود أكثر من طفرة في جين أو أكثر من جينات إستشعار النصاب.

٧- وُجد أن مقاومة الميكروب الصديدي الأخضر للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج كانت عالية لكل من مجموعة الفلوروكينولون ٧٤% لكل من عقار الليفوفلوكسين و عقار السيبروفلوكساسين. بينما كانت ٦٤% من العزلات كانت مقاومة لمجموعات المضادات الحيوية المتعددة (MDR) .

٨- لم يكن هناك أي دلالة إحصائية بين مقاومة الميكروب الصديدي الأخضر للمضادات الحيوية و إنتاج إشارات إستشعار النصاب C_4HSL ($p > 0.05$).

٩- وُجد أن التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن هو ٨ ميكروجرام / مل و قد أستخدم هذا التركيز في التجارب الظاهرية.

١٠- كل العزلات (٣٦) المنتجة لإشارات إستشعار النصاب C_4HSL فشلت في إنتاج هذه الإشارات في وجود التركيز المذكور للأزيثرومايسن (٨ ميكروجرام / مل).

١١- كان هناك دلالة إحصائية بين نسبة إيجابية إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب (إنتاج البايوسيانين ، الرامنوليبد، البروتيازو البايوفيلم) في غياب و وجود التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن. ($p<0.001$)

١٢- و بالنسبة للمثبط **PAβN** ففي وجود ٢٠ ميكروجرام / مل منه تأثر إنتاج إشارات إستشعار النصاب في ١٤ من العزلات ال ٣٦ المنتجة لهذه الأشارات فقد فشلت ٦ عزلات في أنتاج الأشارات تهائياً في وجود المثبت بينما إنخفض أنتاج الأشارات في وجود المثبط في٨ عزلات.

١٣- و حيث أن تأثير مثبط المضخات الطاردة علي إنتاج إشارات إستشعار النصاب كان في ١٤ من عزلات الميكروب الصديدي الأخضرلذلك قد تم أختبار تأثير المثبط علي إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب في هذه العزلات ثم مقارنة هذا التأثير بتأثير التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن.

١٤- كان هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين نسبة إيجابية إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب (إنتاج البايوسيانين ، الرامنوليبد، و البايوفيلم) في العزلات في غياب و وجود كلاً من مثبط المضخات الطاردة (٢٠ ميكروجرام / مل) و التركيز ما قبل الأدني المثبط لنمو البكتريا للأزيثرومايسن (٨ ميكروجرام / مل)

١٥- و بمقارنة نتائج تأثير كل من مثبط المضخات الطاردة و الأزيثرومايسن وُجد أن تأثيرالأخير كان أكثر تثبيطا علي إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب و مع ذلك لم تكن هناك دلالة إحصائية ذات مغزي.

وقد خلُصت هذه الدراسة إلي الاتي:

١- إرتبط إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب بإنتاج إشارات إستشعار النصاب و وجود جينات إستشعار النصاب الأربعة.

٢- وجود عيوب في إنتاج عوامل الضراوة المعتمدة علي إستشعار النصاب إرتبط بغياب جينات إستشعار النصاب أو وجود طفرات بها.

٣- سجلت نتائج هذه الدراسة درجة عالية من مقاومة الميكروب الصديدي الأخضر إلي مجموعة الفلوروكينولون (٧٤%) و الأمييبنيم (٧٠%) و لم يكن هناك دلالة إحصائية ذات مغزي بين مقاومة المضادات الحيوية و إنتاج إشارات إستشعار النصابC_4HSL .

٤- وجد أن تركيز الأزيثرومايسن المستخدم أدي إلي تثبيط كامل (١٠٠%) لإنتاج إشارات إستشعار النصابC_4HSL في العزلات المنتجة لهذه الأشارات مقارنة ب ٣٨,٩% من العزلات في حالة أستخدام مثبط المضخات الطاردة PAβN. ونفس النتيجة لوحظت بالنسبة لإنتاج عوامل الضراوة.