Effect of Some Antimicrobial Chemotherapeutic Agents on the Development of *Toxoplasma gondii* in Mice

A thesis

Submitted to the Council of the College of Medicine

University of Mosul

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy

In

Microbiology (Parasitology)

Submitted By

Ziad Hassan Ahmed Al-Jader

Supervised By

Dr. Abdulsalam Muhammed Al-Mukhtar

Assistant Professor

2006 A.D. *1427 A.H.*

Abstract

Objectives: (1) To evaluate the efficacy of six selected drugs for the treatment of toxoplasmosis. (2) To evaluate the diagnostic validity of the isolation of ***Toxoplasma gondii*** from human placenta. (3) To study the histopathological changes in laboratory mice infected with ***Toxoplasma. gondii***, and to observe the developmental stages of the parasite.

Subjects, materials and methods

This study was conducted during the period from Oct. 2004 to Oct. 2005. Sixty placenta from normal delivery were collected from Al-Batool Teaching Hospital in Mosul and another sixty placenta from aborted women. All samples were examined for ***T. gondii*** infection by direct methods and by inoculation of 1.0 ml tissue suspension of infected placenta with ***T. gondii*** into experimental balb/c mice. Bioassay was done in normal (uninfected mice) to confirm the diagnosis. Histopathological examination of sections from placenta and brain, liver, lung, heart and eye of experimental mice infected with ***T. gondii*** and stained with haematoxylin and eosin method was done. The drugs spiramcycin, norfloxacin, oxytetracycline, azithromycin, trimethoprim, metronidazol and combined treatment of all these drugs each with metronidazole, were all tested for their efficacy against toxoplasmosis in 70 mice. Each mice was inoculated intraperitonally with 0.2 ml of suspension containing 10 tissue cysts of ***T. gondii***, and 20 uninfected mice served as a control. The mice were put under observation for 30 days, and the experiment was terminated 45 days post infection. Microscopical examination and bioassay were done for brain of mice and the living mice were evaluated for the efficiency of drugs used.

Results

Out of sixty aborted placentae, 27(45%) were positive for ***T. gondii***, and out of sixty normal delivery placentae only one (1.6%) was positive by direct microscopical examination. However, inoculation of placental suspension containing ***T. gondii*** in mice showed that, out of 60 aborted placentae 42(76%) were infected and out of 60 non-aborted (normal delivery placentae) only (6%) were infected. The highest percentage (100%) of infection with ***T. gondii*** (tachyzoites) was found in the peritonium fluid of mice after 72 hours of inoculation with tissue cysts and a less percentage (50%) of infection was observed after oral inoculation. Histopathological examination of infected placenta showed necrosis, inflammatory cell infiltration and focal inflammatory reaction in the villi. Histopathological changes in mice showed tachyzoites in brain tissues, inflammatory cell infiltration, necrosis and oedema. In the liver, there was necrosis with the presence of tachyzoites in hepatic cells with enlargement and congestion of blood vesseles in Kupffers cells. Sections from the heart revealed the presence of oedema, necrosis of some myocardial fibres. Necrosis and cellular damages were observed in the eye and lung. Medications were administered separately or in combination. The drugs used in infected mice showed a cure rate of (30%) when mice treated with 250 mg/kg of spiramycin for 2 weeks. When these mice treated with 500 mg/kg for the same period, a higher rate of 60% was observed. A dose of 800 mg/kg/b.w of norfloxacin and 500 mg/kg/day of oxytetracycline resulted in a cure rates of 50% and 30% respectively. Azithromycin (500 mg/kg) showed higher cure rate 80% in infected mice. Other drugs like trimethoprim (200 mg/kg) showed a lower cure rate of 40%. A cure rate of 50% in mice was observed when treated with 200 mg/kg/day of metronidazole. The combined drugs of metronidazole with each of the drugs used in this study showed a

synergestic effect in treatment of experimental toxoplasmosis. The combined dose of 200 mg/kg of metonidazole with 250 mg/kg dose either, azithromyicin and spiramycin, and with 400mg/kg norfloxacin yielded better results and showed a cure rates of 100%, 70%, 80% respectively. A cure rate of 40% and 50% were detected in treated mice using metronidazole 200 mg/kg combined with 250 mg/kg oxytetracycline and 100 mg/kg trimethoprim respectively.

Conclusion

1. Isolation of ***T. gondii*** from human placenta by intraperitoneal inoculation of mice was superior as diagnostic method in comparision to direct microscopical examination.
2. Inoculation of tissue cysts and tachyzoites of ***T. gondii*** in the peritoneal cavity of mice was the best method to get toxoplasmosis.
3. A combined drugs of azithromycin and metronidazole showed a cure rate of 100% in experimental murine toxoplasmosis.

تأثير بعض المضادات الحيوية
على تطور المقوسات الكوندية المعزولة في الفئران

أطروحة مقدمة

إلى مجلس كلية الطب في جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة
في الأحياء المجهرية (الطفيليات)

من قبل

زياد حسن أحمد الجادر

بإشـراف

د. عبد السلام محمد المختار

أستاذ مساعد

١٤٢٧هـ **٢٠٠٦م**

الخلاصـة

أُجريت الدراسة خلال الفترة من تشرين الأول ٢٠٠٤ ولغاية تشرين الأول ٢٠٠٥، وكان الاهتمام الأول والاساس هو في عزل الطفيلي المقوس كوندي من المشيمات البشرية وتشخيصه لغرض احداث الاصابة في الفئران المختبرية من سلالة Balb/c كخطوة اساسية لمتابعة التجارب التي اجريت في هذه الدراسة .

من مجموع 60 مشيمة مجهضة 27 (45%) شخصت اصابتها بالطفيلي مقوس كوندي . ومن مجموع 60 مشيمة غير مجهضة (ولادة طبيعية) فقط 1 (1.6%) كانت مصابة بالطفيلي وكانت عملية التشخيص تتم بوساطة الفحص المجهري المباشر، كما تم حقن الفئران بمحلول معلق المشيمة الحاوي على طفيليات كوندي والذي تم خضوعه للعديد من المعاملات التي انتهت بعزل الاكياس النسيجية وتنقيتها، وكان من مجموع 60 مشيمة مجهضة 42 (76%) كانت مصابة بالطفيلي، في حين أنّ من مجموع 60 مشيمة غير مجهضة (ولادة طبيعية) فقط 6 (10%) كانت مصابة بالطفيلي . كانت هناك نسبة عالية (100%) من الاصابة بالطفيلي كوندي (الحوينات) والتي توجد عادة في الرواشح البريتونية للفئران المصابة بالطفيلي والتي عادة تكون موجود بعد 72 ساعة من الحقن بوساطة الاكياس النسيجية، في حين اقل نسبة (50%) من الاصابة بالحوينات في التجويف البريتوني والذي تمت مشاهدته بعد الحقن الفموي .

كما تمت دارسة التغييرات النسجية للفئران المصابة، واظهر الفحص المجهري آفات التهابية مزمنة في مقاطع الخزع النسيجية تضمنت تنّخرا وارتشاحا خلويا غير متخصص في الدماغ والعين والقلب والرئة والكبد .

كما تم في هذه الدراسة تقييم لكفاءة (6) من المضادة الحيوية المختارة لدراسة تأثيرها منفردة ومقترنة في العلاج التجريبي لداء المقوسات كوندي المستحدث في الفئران ، وهذه المضادات الحيوية سبايرامايسن ، نورفلوكساسين ، اوكسي تتراسايكلين ، ازوثرومايسين، ترايميثوبريم ، ميترونايدازول . اظهرت المضادات الحيوية المذكورة تاثيرا واضحا على حيوية

المقوس كوندي في الفئران إذ عملت هذه المضادات بصورة عامة على اطالة فترة البقاء الحي للفئران المعاجلة بها والتقليل من نسبة الهلاكات مقارنة بمجموعة السيطرة من الفئران غير المعالجة والتي هلكت خلال فترة قصيرة نتيجة الاصابة الحادة بداء المقوسات . تم الحصول على نسبة شفاء (30%) من الفئران المصابة بداء المقوسات الحاد التي عولجت بالمضاد الحيوي سبايرامايسين وبجرعة 250 ملغم/كغم/يوم ولمدة اسبوعين في حين معالجة الفئران بالجرعة 500 ملغم/كغم/يوم بنفس المضاد الحيوي وبنفس المدة المقررة وجدنا نسبة شفاء عالية (60%) . وايضا تم استعمال جرعة 800 ملغم/كغم/يوم من عقار نورفلوكساسين و 500 ملغم/كغم/يوم من عقار اوكسي تتراسايكلين من المضادات الحيوية وكانت النتيجة نسبة شفاء (50%) و (30%) على التوالي ، وكان المضاد الحيوي ازوثرومايسين 500 ملغم/كغم/يوم اظهر نسبة شفاء عالية (80%) من الفئران المصابة ، كما استعمل المضاد الحيوي ترايميثوبريم 200 ملغم/كغم/يوم واظهر نسبة شفاء منخفضة (40%)، في حين نسبة شفاء (50%) في الفئران المصابة عند استعمال 200 ملغم/كغم/يوم للمضاد الحيوي ميترونايدازول .

واظهر استعمال الدواء المقترن المكون من ميترونايدازول مع كل من المضادات الحيوية المذكورة تاثيرا تآزريا واضحا في علاج داء المقوسات في الفئران وشهود ارتفاع ملحوظ في نسبة شفاء الفئران بالعلاج المقترن مقارنة مع مجموعات الفئران الخاضعة للعلاج المنفرد ، اظهر العلاج المقترن من 200 ملغم/كغم/يوم من الميترونايدازول مع 250 ملغم/كغم/يوم من كل من ازوثرومايسين و سبايرامايسين وكذلك 400 ملغم/كغم/يوم من نوروفلوكساسين اظهرت نسبة شفاء (100%) و (70%) و (80%) على التوالي ، في حين ان نسبة شفاء (40%) و (50%) نتيجة علاج الفئران المصابة باستعمل ميترونايدازول 200 ملغم/كغم/يوم مقترنا مع 250 ملغم/كغم/يوم اوكسي تتراسايكلين و 100 ملغم/كغم/يوم من ترايمثوبريم على التوالي .

هذا وان استعمال المضاد الحيوي ازوثرومايسين مقترنا مع الميترونايدازول يعتبر دراسة رائدة ومتميزة حيث لم يسبق ان استعمل سابقا في علاج داء المقوسات .