جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دراسة بعض المؤشرات المناعية وعلاقتها بانواع بكتريا *Staphyloccous spp* المعزولة من مرضى داء الصدفية

أطروحة مقدمة
إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى وهي جزء من
متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

إيناس سعد صبيح الخزرجي

بكالوريوس علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى2013-2014

ماجستير علم الحيوان / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2017

بإشراف

أ.دعباس عبود فرحان **أ.م.د مهى فالح نزال**

1443 هـ **2021 م**

1- المقدمة Introduction

داء الصدفية هو مرض مزمن يتوسطه جهاز المناعة ويصيب أكثر من 125 مليون شخص عالميًا وله آثار ضارة تصل إلى طبقة الأدمة .يتميز المرض بانتكاسة جلدية ، اذ يحدث تضخم البشرة ، وترتبط الاصابة بمرض الصدفية بعدد من الأمراض الخطيرة بما في ذلك أمراض القلب والأوعية الدموية ومتلازمة التمثيل الغذائي وتصلب الشرايين ومرض الانسداد الرئوي المزمن وهشاشة العظام و الاضطرابات الهضمية (Oliveira Mde واخرون ،2015). فقد تم تصنيفه انه من احد انواع أمراض المناعة الذاتية التي تتوسطها الخلايا التائية Tcell (Zangenen و Shooshtary، 2013) يعد العامل الوراثي هو العامل الر ئيسي في الاصابة وهناك عوامل مساعدة مثل على ذلك السمنة والتوتر Strees والتدخين وتناول الكحول (Kofink واخرون ،2013). وتقوم الخلايا اللمفاوية التائية Tcell مع الخلايا المتقرنة والبطانية بأنتاج انواع مختلفة من الحركيات الخلوية ومنها Tumor necrosis factor- alpha (TNF−α) ، Interleukin −22، Interleukin −17 ، Interferon Gamma (IFN−γ) التي لها دور في تطور الامراضية في داء الصدفية (Kim و Krueger، 2015) .

تعد الصدفية من الأمراض الجلدية الشائعة التي تنشأ تأثيرات عده عوامل مسببات ومع ذلك من الصعب معرفة كيف أثرت هذه العوامل فيما بينها مما أدى الى حصول اضطراب في عمل الجهاز المناعي immune system في منطقة ظهارة الجلد skin epithelium مع النسيج الضام connective tissue (Zeng واخرون ، 2017) اذ تحدث الصدفية العديد من الاضطرابات والتفاعلات غير المنتظمة لكلا الاستتجابتين الفطريه والمكتسبه وتؤثر هذه الاضطرابات على النسيج الظهاري للجلد والنسيج الضام (Nestle واخرون ،2009) ولوحظ

معدل انتشار الصدفية يترواح مابين (0.5) إلى (11.4) % لدى البالغين ومن (0) إلى (1.4) % عند حديثي الولادة في جميع انحاء العالم(Michalek وآخرون ، 2017) كذلك التفاعل بين الجهاز المناعي الفطري والمكتسب دور في حدوث مرض الصدفية ، الذي يتصف بزيادة نشاط الخلايا اللمفاوية التائية (T- lymphocytes) ، وزيادة التعبير عن السيتوكينات البادئه للالتهابات ، وهذا يشير إلى أن الخلايا التائية المساعدة T helper 1 (Th1) ، لها دور في تسبب مرض الصدفية ، اذ يحدث في بدايته تنشيط الخلايا التشجرية بشكل خاصة (Dendritic cells)في البشرة والأدمة ، تنتج هذه الخلايا عامل التنخر الورمي (TNF−α) والإنترلوكين (IL−23) ، والتي بدورها تعزز تطور خلايا Th1 و Th17 تفرز هذه الخلايا التائية السيتوكينات التي تساهم في التغيرات للبشره لمرض الصدفية (Mrowietz و Reich ، 2009).

يعد النظام المتمم هو جزء من دفاعات المناعية الفطرية ، يعمل على تميز الميكروبات وجزيئات غير المرغوب للمضيف لتعزيز عملية البلعمة ، وهو أمر أساسي في تخلص من المعقد المناعي ، ينتج عن تنشيط نظام المتمم لتشكيل C3 convertase ، مع انقسام C3 ، وإنتاج قطع المتمم نشطة التي تساعد في عملية الاستساغة opsonisation ، انجذاب كيميائي chemotaxis ، وتحلل الخلايا cytolysis وان عملية تنظيم عمل المتمم complement systemقد يسيطر على الأمراض الالتهابية ، وان الخلل فيه قد يؤدي الى توليد المرض(sjoberg واخرون ، 2009 ؛ Chimenti واخرون ، 2012) تعد C_3 وC_4 من اكثر مكونات المتمم اهمية ، اذ يشكل C_3 الجزء الاكبر من بروتينات المتمم الذي يصنع في الكبد والخلايا اللمفاوية و الليفية والجلد، أما C_4 فيصنع في نسيج الرئة والعظام (علوان، 2015) .

يصاب الجلد ببكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* والتي تعد من الكائنات الممرضة الخطيرة التي تسبب العديد من الاصابات المرضية المختلفة في الجسم ، وذلك لقدرتها على انتاج عدد من عوامل الضراوة Virulance Factors والتي تتمثل بانتاج الانزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes والذيفانات Toxins التي تمنح البكتيريا القابلية على الانتشار والتضاعف داخل انسجة المضيف ، اضافة لمقاومتها المتعددة لمضادات Aminoglycoside و Beta-Lactam مما يجعلها من الممرضات الرئيسية المسببة للاصابات بعدوى المستشفيات Nosocomial infection (Namvar واخرون ، 2014)

تعد من الممرضات المهمة والشائعة وتتواجد بشكل طبيعي على جلد الإنسان والحيوان وترتبط بمجموعة واسعة من أمراض ربما تتدرج من التهابات بسيطة في الجلد والأنسجة الرخوة القيحية إلى اصابات جهازية تهدد الحياة الكائن الحي ، وهي من المكورات الواسعة الانتشار في المستشفيات والمكتسبة بداخلها وخطورة المكورات العنقودية تكمن بأمراضيتها التي تتمثل بعوامل الضراوة المنتجة اذ يرتبط بمرض معين والكشف المبكر عن هذه العوامل بأستخدام بعض الطرق المظهرية والجينية المتمثلة بتقنية البلمرة أمر بالغ الأهمية لغرض إجراء التدخلات العلاجية المناسبة (Reddy واخرون ،2017).وتعتبر هذه البكتريا واسعة الانتشار اذ حوالي 50 % من السكان حاملين لهذه البكتريا ، كما وتعتبر إحدى العوامل الممرضة الانتهازية التي يمكن ان تسبب العدوى ، وهي السبب الرئيسي لالتهاب الأوعية الدموية (Peton وLe loir، 2014) . اشارت الدراسات الى وجود عدد من السلالات البكتيرية التي تنتمي إلى بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* في مرض الصدفية (Gao واخرون، 2008)

ولكن بنسب اقل مقارنة بالامراض الجلدية الاخرى منها التهاب الجلد التأتبي Atopic dermatitis (Drago واخرون ، 2016) ،اذ وجد ان البكتريا الأكثر وفرة في الجلد مرضى الصدفية هي بكتريا *S.aureus* ، و *S. epidermidis* (Chang واخرون ، 2018) وقد وجد ان سلالات *S. epidermidis* تحتوي على جينات معروفة مرتبطة بالفوعة virulence-related genes والتي تسود في الجلد المصاب بالصدفية psoriasis (Rungjang واخرون ، 2020)

2- أهداف الدراسة

تهدف هذه الدراسة تأثير الاصابه بالبكتريا في تحوير الاستجابة المناعية لدى المصابين وللوصول الى ذلك من خلال الاختبارات وتقييم بعض المتغيرات المناعية .

1 - عزل وتشخيص البكتريا التي توجد في مرضى الصدفية

2- التحري المظهري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا التي تم عزلها من آفة الصدفية

3-الكشف عن مقاومة العزلات البكيترية لبعض المضادات الحياتية

4- التحري عن مستويات الحركيات الخلوية Interleukin-36، Interleukin-18 Interleukin-10 Interleukin-8 في مصل الدم لدى مرضى الصدفية ومجموعة السيطرة

5-تقييم دور بروتينات المتمم C_3 وC_4 في مصل الدم لمرضى الصدفية ومجموعة السيطرة

6- تقييم دور IgG ، IgE في مصل الدم لمرضى الصدفية ومجموعة السيطرة.

الخلاصة

تم جمع 80 عينة من مرضى الصدفية وكانت هذه العينات من كل مريض عينه دم ومسحة من الافة الجلدية ، وتم جمعها من مستشفى بغداد التعليمي مركز الامراض الجلدية والزهرية ومن العيادات الخارجية لغرض الحصول على عزلات البكتريا وقد تم عزل على بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* . استمرت الدراسة خلال الفترة من شهر تموز لعام 2019 ولغاية شهر شباط العام 2020 في مستشفى بغداد التعليمي . تم التشخيص الأولي للعزلات باستخدام وسطي أكار الدم و اكار المانيتول والملحي كوسط اختياري . اظهرت الدراسة أن المستعمرات التي تعود لعزلات بكتريا *S.aureus*المخمرة للمانيتول بدت صفراء اللون محاطة بهالة صفراء فيما بدت عزلات بكتريا . *S. epidermidis*وبكتريا *S. hominis* غير المخمرة للمانيتول بلون وردي ولم يظهر أي تغيير في لون الوسط حول مستعمراتها . اضافة لذلك بدت خلايا البكتريا تحت المجهر كروية الشكل متجمعة بشكل عناقيد العنب بعد تصبغها بصبغة كرام ومما سهل العزل المبدئي لهذه البكتريا وكذلك تخمرها لسكر المانيتول والاختبارات الكيموحيوية مثل الأوكسديز والكاتاليز . تم استخدام البطاقة ID GP العائدة الجهاز الفايتك للتشخيص النهائي للعزلات البكتيرية وفقا لنتائج الاختبارات 64 ضمن بطاقة ID GP تم تشخيص 20 عزلة تعود لانواع مختلفه من بكتريا *Staphylococcus spp* و التي شملت : (13) عزلة بنسبة (65 %) *S.aureus* ، (5) عزلة بنسبة (25%) *S. epidermidis* (2) عزلة (10%) *S. hominis* .

تم التحري عن الحساسية للمضادات الحيوية لجميع عزلات بكتريا *Staphylococcus spp* وذلك باستخدام طريقة الاقراص. أظهرت العزلات قيد الاختبار مقاومة عالية بلغت 100% المضادات Cefotaxime ، Vancomycin، Ofloxacin ، Norfloxacin ، Azithromycin ، Oxacillin ، Erythromycin وأقل نسبة مقاومة لمضاد Amikacin.

وتم التحري عن قدرة عزلات *Staphylococcus spp* على انتاج مختلف عوامل الضراوة وهي : الهيمولايسين Hemolysin ، الغشاء الحيوي biofilm ، البروتيز protease ، اللايبيز lipase ، الانزيم المخثر Coagulase المحفظة Capsule ، Staphylokinase كانت نسب انتاج الأنزيم Coagulase للبكتريا *S. aureus* (100%) والبكتريا*S. epidermidis* والبكتريا*S. hominis*. (0%) ،اما الأنزيم lipase للبكتريا *S. aureus* كان (38.5%) والبكتريا*S. epidermidis* (60%) كانت اما لبكتريا*S. hominis* هو (100%) ، كذلك الأنزيمprotease وتكوين المحفظة Capsule للبكتريا *S.aureus* كان (61.5%) والبكتريا *S.*

epidermidis (40%) كانت اما لبكتريا*S. hominis* هو (50%)، وتم الكشف عن قدرة جميع انواع العزلات على انتاج الأنزيم Hemolysin هي(100%) وكذلك تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation بطريقة الاليزا كانت جميع انواع العزلات مكونه لهذا الغشاء بنسبة (100%).

شملت الدراسة المناعية قياس مستوى كل من الحركيات الخلوية (IL-36، IL-18، IL-10، IL-8) اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي عالي ذو دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات IL-36 للمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (513.59± 483.25 pg/ml)، (179.16 ± 217.59) على التوالي ، وبينت النتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي عالي ذو دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات IL-18 للمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (43.75 ± 60.68) pg/ml)، (18.04 ± 34.45) على التوالي ، وقد وجد ارتفاع معنوي عالي ذو دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات IL-10 لمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (225.99 ± 226.76) pg/ml)، (29.64±71.55) على التوالي ، كذلك وجد ارتفاع معنوي عالي ذو دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات IL-8 للمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (64.49 ± 70.63) pg/ml)، (43.04 ± 19.30) على التوالي.

تم قياس مستوى الغلوبيولينات المناعية (IgG، IgE) في مرضى الصدفية وقد اوضحت نتائج الدراسة ارتفاعاً معنوياً عالياً ذوي دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات IgE للمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (12.57± 29.65) pg/ml)، (6.79 ±6.96) على التوالي ، كذلك وجد ارتفاع معنوي عالي ذو دلالة احصائية ($p<0.05$) في مستوى IgG لمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (231.7± 818.6) pg/ml)، (102.8 ±543.7) على التوالي ، قياس مستويات بروتينات المتمم Complement proteins الذي يتضمن (C3 ، C4) اذ وجد ارتفاعاً معنوياً عالياً عند مستوى الدلالة ($p \leq 0.001$) في مستويات تراكيز كل من (C3) في مصل المرضى الصدفية قياساً بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (136.2± 31.0) pg/ml)، (112.1± 23.1) على التوالي ، كذلك وجد ارتفاع معنوياً عالياً ذوي دلالة احصائية ($p\leq0.001$) في مستويات C4 للمرضى الصدفية مقارنة بمجموعة السيطرة اذ بلغت قيم المتوسطات (30.66± 8.178) pg/ml)، (24.38± 4.709) على التوالي