

دراسات ميكروبيولوجيا ومناعية عن الأنماط المصلية الرئيسية لبكتيريا الاستربتوكوكس الرئوية في مصر

رسالة مقدمة من

رحاب حسن باهى حسن منصور

ماجستير العلوم الصيدلية (الميكروبيولوجى و المناعة)
جامعة القاهرة (٢٠١٠)
للحصول على درجة الدكتوراة فى العلوم الصيدلية (الميكروبيولوجى و المناعة)

تحت إشراف

أ.م.د. هيام محمود حسين

استاذ مساعد الميكروبيولوجى

الهيئة القومية للرقابة والبحوث الدوائية

أ.د. مجدى على امين

استاذ الميكروبيولوجى و المناعة

كلية الصيدلة- جامعة القاهرة

أ.م.د أيمن سمير يس

استاذ مساعد الميكروبيولوجى و المناعة

كلية الصيدلة- جامعة القاهرة

كلية الصيدلة

جامعة القاهرة

٢٠١٦

الاستربتوكوكس الرئوية (*Streptococcus pneumoniae*) هي أحد الأسباب الرئيسية لأمراض شديدة مثل الالتهاب السحائي وتسمم الدم والالتهاب الرئوي. و تقريبا، مليون طفل دون سن ٥ سنوات يموتون من داء الالتهاب الرئوي سنويا. بالإضافة إلى ذلك، الاستربتوكوكس الرئوية تسبب التهابات الجهاز التنفسي بما في ذلك التهاب الأذن الوسطى والتهاب الجيوب الأنفية ، فهي تتسبب في حوالي ٣٠٪ إلى ٥٠٪ من حالات التهاب الأذن الوسطى، ونسبة كبيرة من حالات التهاب الجيوب الأنفية والالتهاب الرئوي . الفئات المعرضة للخطر تشمل الأطفال تحت عمر ٢ عاما وكبار السن والمرضى الذين يعانون من نقص المناعة وقد وصفت الاستربتوكوكس الرئوية مؤخرا باعتبارها السبب الرئيسي للالتهاب السحائي بدلا من *Neisseria meningitides* و التي اعتبرت سابقا المسبب الرئيسي للمرض . تناولت بعض الدراسات القليلة السابقة الامراض الرئوية التي تسببت فيها الاستربتوكوكس الرئوية، لكن غالبية الدراسات تناولت الاصابة بالالتهاب السحائي.

تم جمع ما مجموعه ١٠٠ عينات من مصادر مختلفة في القاهرة في الفترة من ٢٠١١-٢٠١٣، وهي تمثل تقريبا جميع الأمراض الناجمة عن *S. pneumoniae* مثل التهاب السحايا والالتهاب الرئوي والتهاب الأذن الوسطى والتهاب الجيوب الأنفية. تم استخدام طرق التعريف التقليدية القائمة على الخصائص الشكلية والبيوكيميائية، وقد وجد ان ١٢% من العزلات مقاومة لل *optochin*. تم استخدام اختبار تحديد الجزيئية (PCR) ل *cpsA* جين لتعريف العزلات. وقد تم التعرف على ١٠٠ عزلة جميعا.

تم اختبار حساسية العزلات لمجموعة من المضادات الحيوية باستخدام طريقة إنتشار القرص. وكشفت النتائج مقاومة عالية لفئات مختلفة من المضادات الحيوية خصيصا للبنسلين (٨٥٪)، التتراسيكلين (٥٥٪) والسلفوناميدات . في حين أن ، الاستربتوكوكس الرئوية لا تزال لديها حساسية عالية نسبيا للماكروليدات والكينولون (حوالي ٦٠٪ و ٨٥٪ على التوالي).

بعد التأكد ان كل العزلات تحتوى على (capsular polysaccharides) تم عمل serotyping (التحديد المصلي) لكل عزلة باستخدام اسلوب ال PCR لتكون واحدة من الانماط المصلية الاتية (١، ٥، ٦B / A، ١٤، ١٦F، ١٩A، ١٩F، ٢٠ و ٢٣F) وقد تم الكشف عن نمط مصلي محدد لكل عزلة، وقد وجد أن: النمط المصلي 6A/B هو الاكثر انتشارا بنسبة ٣٠% من العزلات يليه النمط المصلي 19F بنسبة 28%.

تم تحديد ال Virulence factors التي يمكن ان يعتمد عليها في تعريف الانماط المصلية الاكثر انتشارا. و أثبتت النتائج أن جميع العزلات (١٠٠٪) كانت إيجابية لل (*lytA*) و (*PSaA*)، بينما فقط ٤٤ من أصل ٥٨ (٧٥٪) عزلة كانت إيجابية لل *pneumolysin*، مشيرا إلى أن (*lytA*) و (*PSaA*) هما الأكثر حساسية للكشف عن الاستربتوكوكس الرئوية.

تم عزل السكريات (capsular polysaccharides) من الانماط الأكثر انتشارا(أنماط مصلية 6A/B and 19F)، تم استخراجها وتنقيتها من الحمض النووي والبروتينات، تم تحديد

قيمة السكريات وعمل (GC-MSD)، نتائج الكروماتوغرافي من تحليل pn 6 الى أحادي السكريد من الجلوكوز، الجالاكتوز، رامنوز وريبيتول وبالنسبة الى pn 19F تم التحلل الى السكريات الأحادية الجلوكوز ورامنوز، بينما لم يتم الإفراج عن أحادي السكريد N- acetyl mannosamine

تم إجراء تحليل السكريات باستخدام HPLC لتحديد توزيع الوزن الجزيئي (molecular weight distribution) ومقارنته بالمنتج المتوفر فى الاسواق.

تم تفعيل السكريد بإضافة (CDAP) (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium)، ثم تم الاقتران بالبروتين (Bovin serum albumin). و تم تنقية السكريد المقترن بالبروتين بطريقة ultrafiltration باستخدام كبريتات الأمونيوم.

تم تقييم القدرة المناعية لل polysaccharide متعدد السكريات المقترن بالبروتين الذى تم تحضيره من الانماط المصلية (pn 6A/B and pn 19F) عن طريق التحصين النشط لفئران BALB / C باستخدام pn 19F و pn 6A / B بشكل منفصل، تم الكشف عن استجابات الأجسام المضادة عن طريق ال ELISA. وأشارت النتائج الى وجود فرق فى تتر الاجسام المضادة ضد السكريات النقية والمقترنة بالبروتين . وقد تم اختبار التحدي للفئران عن طريق التحصين باستخدام سلالات الاستربتوكوكس الرئوية، حيث كان هناك اختلاف كبير بين معدلات البقاء على قيد الحياة من المجموعة التى تم تلقحها والمجموعة التى لم يتم تلقحها.

توصي الدراسة المراقبة المستمرة للانماط المصلية السائدة فى مصر مع الوقت وتوضح قدرة إنتاج لقاح من السكريات المحضرة من بكتيريا الاستربتوكوكس الرئوية و المقترنة بالبروتين، والتي قد تكون الطريقة المثلى للحد من أمراض الاستربتوكوكس الرئوية.