University of Mosul
College of Science

Assessment of Some Microbiological and Immunological Factors in Leukemia Patients

Payman Akram Hamasaeed

Ph.D. Thesis
In
Biology / Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Al-Rawi

2014 A.D. **1435 A.H.**

Abstract

This study was carried out in the Nanakaly hospital for blood disease in Erbil city during December 2012 to December 2013.The study was designed to assess types and frequency of microorganisms and some immunological parameters of 100 enrolled patients afflicted with different types of leukemia, before and after induction phase chemotherapy and immunophenotyping by flow cytometry before induction phase.

The number and percentages of acute leukemia patients was higher 84 (84%) than chronic leukemia 16(16%) ,and B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patients were higher 38(70.4%), than T-cell ALL 16(29.6%). The highest number of the ALL patients was subtype L1 35(64.8%) .While the highest number of Acute Myeloid Leukemia (AML) subtype was M4 10(33,3%) patients. The highest percentage of patients were in Basra (25%) and lowest in Duhok were (3%).Most of patients were males.

The mean of WBC were elevated significantly before treatment and declined after treatment 42.47/4.41, 46.06/3.19 , 56.48/31.35 and 82.12/31.75 x 10^9 /L for ALL,AML, Chronic Lymphoblastic Leukemia(CLL) and Chronic Myeloid Leukemia(CML) respectively. Mean of hematological parameters were reduced before and after induction phase chemotherapy as compared with control group.

From total microorganisms 158 isolates before and 397 isolates after induction phase chemotherapy according to types of leukemia. The total number and percentages of microorganisms in acute leukemia were 76/158(48.1%), 187/397(47.1) in ALL and 66/158 (41.8), 151/397(38) in AML patients 13/158 (8.2), 35/397(8.8) in CLL and 3/158(1.9), 24/397(6.1) in CML patients before and after induction phase chemotherapy.

The bacterial infection was mainly due to gram positive bacteria with number and (percentages)74/158(46.8) , 180/397(45.3),followed by gram negative bacteria 60 /158(38), 123/397(31) before and after induction phase chemotherapy . Before starting chemotherapy *C. albicans* were 20(83.3) in oral cavity and 1(4.2) on skin, while *C. lusitaniae* were 2 (8.3) in oral cavity only and *C.famata* were 1 (4.2) on skin only. While after induction phase chemotherapy *C.albicans* were 26(81.3) in oral cavity and 24(47.1) on skin, *C. lusitaniae* were5 (15.6) in oral cavity and 14(27.5) on skin, while *C. famata* were 1 (3.1) in oral cavity and 13(25.5) on skin. The number of DNA copies of hepatitis B virus (HBV) in leukemia patients were calculated by real time PCR. The positive case was 11/397(2.8) patients only after chemotherapy.

The most common *Staphylococcus Spp* isolates was *S. epidermidis* 28(57.1) ,40(40.8), while the most gram negative bacteria was *E. coli* , 20(33.3) ,40(32.5).Skin was the most common infection site 65(48.5),117 (38.6) isolates followed by oral cavity was 33(24.6) ,89(29.4), urine 34 (25.4),71(23.4), and blood 2 (1.5), 26(8.6) bacterial isolates before and after chemotherapy.

Meropenem was the most effective antibiotic against gram negative bacteria and Benzylpenicillin was the most effective antibiotic against gram positive bacteria in leukemia patients.

Mean concentration of IL-6 before treatment was higher (648.14),(733.33),(516.66) and(500.00pg/mL) in ALL,AML ,CLL and CML and significantly declined to 259.25 , 233.33 , 216.66, 200 pg/mL respectively ($P \leq 0.01$,$P \leq 0.05$). While variation in mean concentration of serum IL-17A was not significantly $P>0.05$. Increasing in the IFN-γ level was observed before treatment and significant decreasing of IFN-γ level in ALL and AML and CML patients .The mean concentration of serum TNF-α was higher 49.07/21.94 , 58.50/19.66 pg/mL in serum of ALL and AML patients before / after treatment when compared with its mean concentration (8.80pg/ml) in serum of control.

The mean concentration of serum immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) were higher in newly diagnosis patients and decline in ALL,AML ($p \leq 0.01$)and in

CLL and CML patients respectively (p>0.05) after induction phase chemotherapy. The mean concentration of C3and C4 was higher before induction phase as compared to control group and significantly decreased after induction phase in ALL and AML respectively (P≤0.01)and not significantly in CLL and CML (P>0.05) .The mean activity of GOT ,GPT and AL.P was elevated in newly diagnosed patients with leukemia when compared with its mean activity in serum of control group and increased after treatment.

Flow cytometry study shows that the lymphoblasts of B-cell ALL patients were positive for the B-cell markers CD19 , cyCD79a , CD 34 and CD10 . The immunophenotype of T- cell ALL patients expressed CD1a , CD2 , CD5, CD7 , CD3 and CD34 on their blast cell. The myeloid cells of AML patients expressed cyMPO, CD33, CD13 , CD 117,CD15,CD34,CD64,CD36 and CD14. Immunophenotype of B-CLL shows that the lymphoblast of all patients were expressed CD23 , CD19 ,CD5, CD20 .

جامعة الموصل
كلية العلوم

تقييم بعض العوامل المايكروبايولوجية والمناعية لمرضى سرطان الدم

بيمان أكرم حمه سعيد

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة/ علم الأحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ الدكتورة أميرة محمود محمد الراوي

1435هـ 2014م

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مستشفى نانه كه لى لأمراض الدم في مدينة أربيل, للفترة من كانون الأول 2012 إلى كانون الأول 2013, وقد صمّمت هذه الدراسة للتحري عن عدد ونوع الأحياء المجهرية, والحالة المناعية, لـ100 مرضى مصابين بانواع مختلفة من سرطان الدّم قبل وبعد الطور المستحدث من العلاج الكيميائي, وتحديد النمط المظهري المناعي باستخدام جهاز الفلوسايتوميتر قبل العلاج.

أظهرت الدراسة أنَّ عدد المرضى المصابين بسرطان الدم الحاد أعلى 84 (84%) من عدد مرضى سرطان الدّم المزمن 16 (16%), وعدد مرضى السرطان الحاد الليمفاوي من نوع خلايا B كان أعلى 38 (70.4%) من المصابين بسرطان خلايا T 16 (29.6%),وأن تحت النوع السائد في ALL كان L1 بلغ 35 (64.8) مريضاً, أمّا في مرضى AML فقد كان تحت النوع M4 10 (33.3) مرضى, و أن أعلى نسبة للمرضى كانت من محافظة البصرة (25%) فيما كانت أقلّ نسبة من محافظة دهوك(3%).معظم المرضى كانوا ذكورا.

ارتفع معدل كريات الدم البيضاء قبل العلاج و انخفض بعد العلاج 42.47 / 4.41 و 46.06 / 3.19 و 56.48 / 31.35 و 82.12 / 31.75 x 109 /لتر لكلّ من مرضى ALL وAML و CLL و CML على التوالي وآنخفض معدّل جميع العوامل الدمويّة قبل البدء بالطور المستحدث من العلاج الكيميائي مقارنة بمجموعة السيطرة.

من مجموع الكائنات الحيّة المجهرية 158 قبل و397 عزلة بعد بالطور المستحدث من العلاج الكيميائي طبقاً لأنواعِ اللوكيميا. العدد الكليّ والنِسَب المئوية مِنْ كائنات حيّة مجهرية في اللوكيميا الحادِّ كَانتْ 158/76 (48.1)، 397/187 (47.1) في مرضى ALL و158/66 (41.8)، 397/151 (38) في مرضى AMLو (8.2) 13/158)، 8.8) 35/397) في مرضى CLL و158/3 (1.9)، 397/24 (6.1) في مرضى CML قَبلَ وَبَعد بالطور المستحدث من العلاج الكيميائي

أظهرت الدراسة ان اغلب الاصابات سببتها انواع الجراثيم الموجبة لصبغة كرام,بلغت اعدادها ونسبها المئوية158/74(46.8) و397/180(45.3) تلتها الجراثيم السالبة لصبغة كرام158/60(38) و397/123(31) قبل وبعد الطور المستحدث من العلاج الكيميائي. قبل بَدْء العلاج الكيمياوي *C. albicans* كَانتْ 20 (83.3) في التجويفِ الفمي و1 (4.2) على الجلدِ، بينما *C. lusitaniae* كَانتْ 2 (8.3) في التجويفِ الفمي فقط و*C. famata* كَانتْ 1 (4.2) على الجلدِ فقط. بينما بعد بَدْء بالطور المستحدث من العلاج الكيميائي *C. albicans* كَانتْ 26 (81.3) في التجويفِ الفمي و24 (47.1) على الجلدِ، *C. lusitaniae* كَانتْ 5 (15.6) في التجويفِ الفمي و14 (27.5) على الجلدِ، بينما *C. famata* كَانتْ 1 (3.1) في التجويفِ الفمي و13 (25.5) على الجلدِ.

عدد نسخDNA لفيروس (HBV) في مصلِ مرضى اللوكيميا حُسِبَ بطريقة Real time PCR الحالات الإيجابية كانت 11/ 397(2.8) مريضا فقط بعد العلاج الكيميائي.

أن النوع السائد لعزلات جراثيم العنقوديات هو *S. epidermidis* 28(57.1) ,40 (40.8), فيما كانت جرثومة *E. coli* هي السائدة من بين الانواع السالبة لكرام 20(33.3) ,40 (32.5) قبل وبعد العلاج الكيميائي.تبيّن أنَّ الموقع الأكثر عرضةً للإصابة هو الجلد 65 (48.5) و 117 (38.6) عزلة تليها تجويف الفم 33 (24.6) و 89 (29.4), وفي الإدرار 34 (25.4), 71 (23.4), ثمَّ الدّم 2 (1.5) و26 (8.6) عزلة قبل وبعد العلاج الكيميائي.

بينت النتائج ان المضادالحيويMeropenem هو الافضل تجاه الجراثيم السالبة لكرام وان المضاد Benzylpenicillin هو الافضل تجاه الجراثيم الموجبة لكرام في مرضى سرطان الدم.

كان معدّل تركيز الانترلوكين 6 مرتفعاً (648.14) و(733.33) و(516.66) و (500) بيكوكرام/مل في مصول المرضى قبل العلاج في ALL و AML و CLL و CML على التوالي, وانخفض معنوياً إلى (259,25) و (233,33) و(216.66) و(200 بيكوكرام/مل)على التوالي ($p\leq 0.01$ و $p\leq 0.05$).في حين كانت التغييرات في معدّل الانترلوكين 17A في المصول غير معنويّ ($p> 0.05$), ولوحظت زيادة في مستوى انترفيرون γ- IFN قبل العلاج, وانخفض معنوياً في مرضى ALL وAML CML . وكان معدّل تركيز α -TNF كان عالياً 49.07 / 21.94و 58.50/ 19.66 بيكوغرام /مل في مصول مرضى ALL و AML قبل العلاج وبعده مقارنة بمعدّل التركيز في مصل مجموعة السيطرة (8.80) بيكو غرام / مل.

وكان معدّل تركيز اميونوكلوبيولينات (IgG و IgA و IgM) عالياً في المرضى المشخصين حديثا, وانخفض في ALL و AML ($p\leq 0.01$) و في CLL و CML ($p> 0.05$) بعد الطور المستحدث في العلاج الكيميائي. وارتفع معدل تركيز C3 و C4 في المرضى قبل مرحلة العلاج المستحدث, وانخفض معنويا في ALL وAML ($p\leq 0.01$), وغير معنويٍ في CLL و CML ($p> 0.05$). وارتفع معدل نشاط GOT و GPT و A. PH في مرضى حديثي التشخيص بسرطان الدّم مقارنة بمعدل نشاطها في مصل مجموعة السيطرة, وقد زاد النشاط بعد العلاج.

وأظهرت دراسة الخلايا بجهاز الفلوسايتوميتر بأنّ الخلايا السرطانية لمرضى B-ALL كانت موجبة للعلامات المناعية لخلايا B, CD 19, cyCD 79a, CD 34 و CD 10. ان النمط المظهري المناعي لخلايا T-ALL عبر عن ظهور CD1a وCD2 و CD 7 و CD3و CD34 على الخلايا السرطانية, وظهرت الخلايا المحبّبة لمرضى AML العلامة المناعية CyMPO و33 CD و13 CD و117 CD و CD 15 و CD 34 و CD 64 و CD 36 و CD 14. وبيّنَ النمط المظهري المناعي لخلايا B-CLL بأنَّ الخلايا السرطانية للمرضى أظهرت CD 23, CD 19, CD 5, CD 20.