وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

الكشف عن بكتريا *Neisseria meningitidis* في سائل النخاع الشوكي والدم باستخدام تقنية الـPCR وفحص التلازن والزرع البكتيري

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان

من

رنا عبد الحمزة الگرعاوي

بكالوريوس تربية / جامعة كربلاء 2003

بإشراف

أ.م . د هيام عبد الرضا كريم العواد

صفر١٤٣٥ هـ **كانون الاول٢٠١٣ م**

بسم الله الرحمن الرحيم

{ وَ إن يَمْسَسْكَ اللّه بِضُرٍّ
فَلاَ كَاشِفَ لَهُ إلاّ هُوَ وَ
إِن يُرِدْكَ بخَيْرٍ فَلاَ رَادَّ
لِفَضْلِهِ يُصِيبُ بِهِ مَنْ
يَشَاءُ مِن عِبَادِه و هُوَ
الغَفُورُ الرَّحِيمُ }

صَدَقَ اللّه العلي العظيم

(سورة يونس :

الآية ١٠٧)

الإهداء

الى مدينة العلم وبابها....
الى سفينة النجاة
وركابها....رسول الرحمة محمد
وآله ألأطهار صلى الله عليهم اجمعين

الى شعاع الأمل الذي اسير على
خطاه رغم رحيله....
ذكرى والدي

الى من لا يمل اللسان من الدعاء
لها وفاءً....
الى من لا تمل العين من رؤية
وجهها ضياءً....
والدتي حفظها الله

الى من أشدُّ بهم أزري..سندي
وملجأي ....
أخوتي وأخواتي

الى كل العقول النيرة والأقلام
النابضة بالحياة....

أهدي هذا الجهد

رنـــا

شكر وتقدير

الحمد لله حمداً أستتم به نعمته...وأستعجل به رحمته...وأستبعد به عذابه ونقمته...فهو الذي جعل الحمد مفتاحاً لذكره...وخلق الأشياء ناطقة بحمده وشكره...والصلاة والسلام على رسوله محمد وعلى سائر انبيائه ورسله وآله الطيبين وجمعه المخلصين ومن اتبع هداه الى يوم الدين ...أما بعدُ ؛

فمن حقيقة الشكر الثناء على المحسن بذكر احسانه ولأن شكر الناس من شكر الله سبحانه فلا يسعني إلا ان اتقدم بالشكر الجزيل وفائق التقدير الى استاذتي الفاضلة الدكتورة **هيام عبد الرضا العواد** لاقتراحها موضوع البحث وإشرافها المباشر ولكل ما بذلته من اجلي لأن الانسان لا يقوم وحده.كما وأقدم شكري الجزيل الى الدكتور الفاضل **حسين جواد المنكوشي** لما قدمه من مساعده .

واعترافاً مني بالجميل اتقدم بالشكر الى رئاسة قسم علوم الحياة والى عمادتي كلية العلوم وكلية التربية للعلوم الصرفة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي ، والى كادر مختبر البكتريا في مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الحسين (ع)التعليمي لما قدموه من تسهيلات لإنجاح هذا البحث.

وأقدم خالص شكري الجزيل وتقديري الى الأستاذ **حسن محمود ابو المعالي** / كلية الصيدلة/جامعة كربلاء لإبداءه النصح والمساعدة ، والى الاستاذ الدكتور **زهير محمد علي جدوع** والدكتور **مهند محسن** /كلية الطب لآرائهم العلمية السديدة ،والى كل من ساعدني من قول او فعل وبالأخص (الست **لقاء حسون** ، ،الاستاذ **قيصر عبد السجاد**).

خالص شكري وامتناني الى زملائي طلاب الدراسات العليا في قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة.

اما والدتي وإخواني واخصهم بالذكر اخي العزيز **محمد** الذي مدَّ يد العون بكل ما استطاع فالكثير قليل بحق فضلهم ودعائهم،واسأل الباري ان يمد في اعمارهم ويوفقني لما يرضيه ويرضيهم .

والله ولي التوفيق

رنـــــا

الخلاصة

يعد مرض السحايا من الامراض المهمة اذ تعطي بعض الحالات المرضية نتيجة زرع سالب على الرغم من وجود الاعراض السريرية والاستجابة الالتهابية وقد يعود السبب الى العلاج المسبق بالمضادات الحيوية ، لذا تم اختيار هذه الدراسة لتسليط الضوء على تحديد الدقة التشخيصية والفائدة السريرية للطرائق المستخدمة في الكشف عن بكتريا *Neisseria meningitidis* في عينات سائل النخاعي الشوكي(CSF) Cerebrospinal fluid وعينات الدم كتقنية تفاعل البوليمر المتسلسل(PCR)Polymerase chain reaction ومقارنتها مع طريقة الزرع الروتينية وطريقة اختبار التلازن (LA) Latex test .

تم جمع 50 عينة CSF و50 عينة دم للمرضى المشكوك بهم التهاب السحايا او تسمم الدم المراجعين لمستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الحسين(ع) التعليمي والذين تم تشخيصهم سريرياً من قبل الاطباء الاختصاصيين في المستشفى اذ جمعت عينات سائل النخاعي الشوكي (CSF) من العينات المرسلة الى مختبر البكتريا في المستشفى وتم سحب عينة الدم من ذات الاشخاص قيد الدراسة الراقدين في وحدة الطوارئ او وحدة العناية المركزة Intensive care unit(ICU) او وحدة الامراض الانتقالية خلال المدة 1-12-2012 ولغاية 1-5-2013 .

تم زرع راسب عينات الـ CSF وعينات الدم في الاوساط التقليدية ،كما تم فحص عالق الـ CSF باستخدام اختبار التلازن (LA) للكشف عن المستضد المحفظي المتحرر من بكتريا *N. meningitidis* وكذلك تم استخلاص الـ DNA البكتيري من عينات الـ CSF والدم لغرض الكشف عن وجود الجين *ctrA* باستخدام تقنية الـ PCR .

اظهرت نتائج الدراسة ان الطريقة الزرعية الروتينية اعطت نتيجة زرع جرثومي سالب بنسبة 0.0% لكل من عينات الـ CSF وعينات الدم في حين ادى اختبار التلازن الى تشخيص ثمانية حالات (16.0%) من مجموع عينات الـ CSF ،بينما بلغت عدد الحالات المشخصة بتقنية الـ PCR 12حالة (24.0%) من مجموع عينات الـ CSF و15حالة (30.0%) من مجموع عينات الدم .كذلك اظهرت النتائج ارتفاع حالات الاصابة بمرض السحايا المتسبب عن

بكتريا *N. meningitidis* لدى الذكور مقارنة بالإناث اذ بلغ مجموع حالات الاصابة في عينة الدم للمرضى الذكور بطريقة الـ PCR تسع حالات (16.1%) وللإناث ستة حالات (13.6%)، في حين بلغ عدد حالات الاصابة في عينات الـ CSF بطريقة اختبار التلازن والـ PCR للمرضى الذكور 11 حالة (13.1%) وللإناث تسع حالات (13.6%) .

وفي ضوء ما قدمته نتائج الدراسة نستنتج ان تقنية الـ PCR هي الطريقة الأكفأ والأكثر دقة وفائدة في الكشف عن البكتريا في عينات الـ CSF وعينات الدم لحالات مرضى السحايا المشكوك فيها ،ونسبة الكشف الافضل سُجلت من عينات الدم .

قائمـــــة المحتـــويـــاتList of contents

ت	الموضوع	ص
	الفصــل الأول	
	المقـــــدمـــــــة	1
	الفصــل الثاني	
	استعـــــراض المـــــراجع	
1-2	لمحة تاريخية	4
2-2	نظرة تشريحية لأغلفة السحايا	6
3-2	فسيولوجية السائل النخاعي الشوكي CSF	8
4-2	التهاب السحايا	9
1-4-2	تعريف المرض و انواعه	9
1-1-4-2	التهاب السحايا الفايروسي	9
2-1-4-2	التهاب السحايا البكتيري	10
1-2-1-4-2	طرائق الاصابة وآثار المرض	11
2-2-1-4-2	عوامل الخطورة لالتهاب السحايا البكتيري	12
3-2-1-4-2	انواع البكتريا المسببة لالتهاب السحايا البكتيري	13
5-2	بكتريا المكورات السحائية (meningococcus) *N. meningitidis* بوصفها مسبب لالتهاب السحايا	15
1-5-2	الصفات العامة	15
2-5-2	تصنيف بكتريا *N. meningitidis*	16
3-5-2	امراضية بكتريا المكورات السحائية	18
4-5-2	طريقة الاصابة بالبكتريا وخطوات حدوث المرض	20
5-5-2	الاعراض والعلامات السريرية للمرض	23
6-5-2	عوامل الضراوة	25
1-6-5-2	المحفظة	25
2-6-5-2	الذيفانات	26
3-6-5-2	الاهلاب (الشعيرات)	28

4-6-5-2	الانزيم الحال للبروتينات	29
5-6-5-2	بروتينات الغشاء الخارجي	30
7-5-2	وبائية بكتريا المكورات السحائية	30
8-5-2	طرائق التشخيص المختبري لمرض التهاب السحايا	34
1-8-5-2	التشخيص البكتيري بالاستنبات	34
2-8-5-2	التشخيص بالطرائق المناعية	35
3-8-5-2	التشخيص الجزيئي	36
الفصل الثالث		
ت	**المـواد وطرائق العمـل**	**ص**
1-3	المواد والأجهزة المستخدمة	39
1-1-3	الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة	39
2-1-3	المواد الكيميائية والكيمياحيوية والعدد	41
2-3	طرائق العمل	42
1-2-3	تحضير الاوساط الزرعية	42
1-1-2-3	وسط اكار الدم	42
2-1-2-3	وسط اكار الدم المسخن	42
3-1-2-3	وسط نقيع القلب والدماغ	42
2-2-3	جمع العينات	42
3-2-3	فحص العينات	44
1-3-2-3	طرائق الزرع الاولية والثانوية والتشخيص	44
2-3-2-3	مبدأ وطريقة عمل اختبار اللاتكس	45
3-3-2-3	الفحوص الجزيئية	47
1-3-3-2-3	استخلاص الـ DNA	47
2-3-3-2-3	التوصيف الجزيئي للجين *ctrA*	49
3-3-3-2-3	تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل للجين *ctrA* الخاص ببكتريا *N. meningitidis*	51
4-3-3-2-3	تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل الكهربائي	52
5-3-3-2-3	التحليل الاحصائي	53

الفصل الرابع		
ت	النتائـــــج والمناقشـــــة	ص
1-4	تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـ PCR	54
2-4	تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـ CSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن وتقنية الـ PCR	56
3-4	تأثير الجنس في نسب وجود او عدم وجود بكتريا*N. meningitidis* في عينات الدم وعينات الـCSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن وبتقنية الـ PCR	59
4-4	الدراسة الجزيئية	62
5-4	الجدوى العملية للطرائق المختلفة في تشخيص مرض السحايا في للانسان	64
	الاستنتـــــاجات والتوصيـــــات	
	الاستنتاجات	66
	التوصيات	67
	المصـــــــــــــــادر	
	المصادر العربية	68
	المصادر الاجنبية	69

قائمة الجداول

ت	الموضوع	ص
1-2	تصنيف بكتريا *N. meningitidis* مصلياً	17
1-3	الاجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة	39
2-3	المواد الكيمائية والكيمياحيوية والعدد المستخدمة في الدراسة	41
3-3	المواد المستخدمة في استخلاص الـ DNA	47
4-3	البادئات المستخدمة في الكشف الجزيئي عن الجين *ctrA* لبكتريا *N. meningitidis*	50
5-3	المواد المستخدمة في تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل	51
6-3	برنامج Touch down المستخدم للكشف عن الجين*ctr A* لبكتريا *N. meningitidis*	51
1-4	النسبة المئوية لعزلات بكتريا*N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـ PCR	54
2-4	النسبة المئوية لعزلات بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن وتقنية الـ PCR	57

3-4	تأثير الجنس في نسب وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بطريقتي الزرع والـ PCR	60
4-4	تأثير الجنس في نسب وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـ CSF بطرائق الزرع والتلازن والـ PCR	61

قائمة الاشكال

ت	الموضوع	ص
شكل(2-1)	مراحل النشوء المرضي لبكتريا *N. meningitidis*	21
شكل(3-1)	مخطط يوضح مبدأ الدراسة	44
شكل(4-1)	الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR للجين *ctrA* على 2% جل الاكاروز عند 70 فولت ولمدة 45 دقيقة	63

قائمة الملاحق

ت	الموضوع	ص
1	نتائج اختبار البادئات باستخدام اختبار In-silico لتضخيم البادئ بتطبيقه على اغلب الانواع البكتيرية المسببة لمرض السحايا	91
2	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بطرائق الزرع البكتيري والـ PCR	98
3	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF باستخدام طرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR	98
4	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis*في عينات الـCSF للمرضى الذكور بطرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR	99
5	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N .meningitidis* في عينات الـ CSF للمرضى الإناث بطرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR	99
6	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم للمرضى الذكور بطرائق الزرع البكتيري والـ PCR	100
7	النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N.meningitidis* في عينات الدم للمرضى الإناث بطرائق الزرع البكتيري والـPCR	100

قائمـــة المختصـــرات

List of Abbreviations

Terms المصطلح	Symbol المختصر
Advisory Committee on Immunization Practices	ACIP
Antibody	AB
Blood-Brain Barrier	BBB
Brain Heart Infusion Broth	BHI
Cluster of differentiation 14	CD14
Centers for Disease Control and Prevention	CDC
Central Nervous System	CNS
Cerebrospinal fluid	CSF
Deoxyribonucleic Acid	DNA
Food and Drug Administration	FDA
Haemoglobin-binding protein	Hbp
Herpies Simplex Virus	HSV
Human Immunodeficiency Virus	HIV
Immune complement 3	C3
Immunoglobulin Alpha	IgA
Immunoglobulin Gama	IgG
Interleukin-1	IL-1
Invasive meningococcal disease	IMD
Latex agglutination	LA
Lipo-oligosaccharide	LOS
Lipopolyscharide	LPS
Lumber puncture	LP
Lysosome-associated membrane protein 1	LAMP1
Major Histocompatibility Complexes	MHC
Membrane cofactor protein	MCP
Meningococcal secreted proteins	MSPs
Outer membrane proteins	OMP
Peripheral Nervous System	PNS
Polymerase chain reaction	PCR
Sodium Dodecyl Sulphate	SDS
Sodium polyanethole sulfonat	SPS
Toll Like Receptors	TLRs
Transferrin	Tf
Tris-Borate-EDTA buffer	TBE
Tris- EDTA buffer	TE
Tumor necrosis factor- α	TNF-α

Type IV pili	Tfp
Virulence Factors	VFs
World Health Organization	WHO

الفصل الاول

المقـــــدمة

Introduction

المقدمة Introduction

على الرغم من تحسن نظام العناية الصحية ، يبقى مرض التهاب السحايا Meningitis من الأمراض المُعدية الطارئة المهددة للحياة (Chakrabarti *et al*.,2009)، وأغلب العدوى تحدث للأطفال الرضع، وقد تنشأ كذلك لدى الأطفال الأصحاء ومن هم في سن المراهقة وكذلك البالغين (Saravolatz *et al*.,2003). وقد يسبب المرض تلفا حادا ينتهي بالوفاة وربما يؤدي إلى الشلل والصمم وضعف العضلات والتخلف العقلي والصحي ويعد الإنسان الضعيف مناعيا أكثر تعرضا للمرض (Flier *et al*.,2003; Shapera and Leib,2003).

يعرف التهاب السحايا بأنه التهاب السائل النخاعي الشوكي والأغشية الرقيقة المحيطة بالدماغ والحبل الشوكي(النخاع) وتدعى هذه الأغشية السحايا Meningis (Patel *et al*., 2008) .

ينشأ المرض نتيجة التعرض لأحد المسببات الشائعة التي تشمل الإصابات الفايروسية Viral meningitis والتي غالبا يشفى منها المريض دون الحاجة الى علاج نوعي ، غير ان الإصابات البكتيرية Bacterial meningitis للسحايا تكون بالغة الشدة وقد تؤدي الى الهلاك او الى ضرر وأذى دماغي حتى وإن تمت معالجته (Meningitis Research Foundation Offices,2007)، وهي اكثر شيوعا عند مقارنتها بالإصابات الفطرية والطفيلية (Charles , 2004 a ;Thomas *et al*.,2002) . فضلاً عن ان المرض قد يتسبب بمجاميع اخرى من الاحياء المجهرية كالأوليات Protozoa والخمائر Yeast (Pahari ,2004) .

ان أغلب الدراسات تشير الى ان بكتريا *N. meningitidis* هي العامل الممرض الرئيس لالتهاب السحايا بين الاشخاص الذين يتواجدون ويعيشون في نفس المكان (Ataee *et al*. ,2005) ومسببة بما يقارب 1.2 مليون حالة لالتهاب السحايا البكتيري والتعفن للدم عالميا(WHO, 2006 ; Pathan *et al*., 2003) و135000 حالة وفاة كل سنة (Tan *et al*., 2010 ; Stephens *et al*., 2007) . أشارت مؤسسة National Institute for Health and Clinical Excellence ، (2010) الى ان المسببات الأكثر حدوث وتردد لالتهاب السحايا البكتيري لدى الأطفال وصغار السن بعمر ثلاثة أشهر او اكثر تشمل كل من بكتريا النيسيرية السحائية *Neisseria meningitidis* ،العقديات الرئوية *Streptococcus pneumonia (*pneumococcus) والمستديمة النزلية *Haemophilus influenza* type b(Hib) .

تأتي اهمية بكتريا *N. meningitidis* لدورها الممرض للإنسان الذي يعد المستودع الطبيعي الوحيد لها فهي تستوطن البلعوم الأنفي وتصيبه عرضيا بنوعين رئيسين من الأمراض

هما التهاب سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal meningitis وتسمم(تعفن) الدم بالمكورات السحائية Meningococcal septicemia، الإصابة عادة تكون غير متكشفة (كامنة) وفي بعض الحالات تنشأ التهابات موضعية تظهر بشكل التهاب الأنف والبلعوم ، يعود ذلك لامتلاك البكتريا للعديد من عوامل الفوعة منها قدرتها على انتاج السموم الداخلية Endotoxins التي تتحرر بتحللها الذاتي (Ananthanarayan and Paniker,2009) وافرازها للبروتينات الخارجية Exoproteins (Robinson *et al.*,2004) فضلا عن انتاج العديد من الأنزيمات (Sainsbury *et al.*,2010).

أشار Bohr وجماعته(1983) ان التأكيد على التشخيص يمكن ان يتم من عينات الـCSF في ما يقارب (90%) من المرضى. إلا انه قد يكون من الصعب الحصول او منح عينة الـ CSF خصوصا من الرضع الصغار، أو قد تعطي عملية البزل الظهري القطنيLumber puncture (أي عملية سحب عينة الـCSF بطريقة وخز المنطقة القطنية) دلالة خاطئة ومؤشر عكسي بسبب ارتفاع الضغط داخل القحف (Richards and Towu- Aghantse,1986) . إن الكشف عن المرض المؤكد يتطلب عزل بكتريا *N. meningitidis* من مناطق تكون في العادة معقمة طبيعيا من أي وجود بكتيري والطريقة النموذجية تتم بعزلها من سائل النخاع الشوكيCerebrospinal fluid(CSF) او الدم (Granoff *et al.*,2003) ،

المعيار المتداول للتشخيص المختبري يعتمد على طريقة الزرع لعينات الـ CSF او لعينات الدم باستخدام اوساط اغنائية خاصة لإنماء هذه الأنواع من البكتريا المرضية (Wylie *et al.*,1997;Schurman *et al.*,2004) ، بالإضافة الى فحوصات الزرع الجرثومي ، يوفر فحص التلازن latex agglutination كشف سريع لمادة عديد السكريدOligosaccharide الداخلة في تركيب محفظة البكتريا في عينات الـ CSF (Rosenstein *et al.*,2001) اذ تظهر فائدة الكشف في الحالات التي لا يعطي فيها الزرع نتيجة للنمو البكتيري بعد حضن لمدة 48 ساعة(Surinder *et al.*,2007).

ولأنه اصبح من الصعوبة المتزايدة اعتماد تشخيص اصابات المكورات السحائية بواسطة الطرق الزرعية التقليدية(Carrol *et al.*,2000) ، ففي السنوات الحالية تم ادخال وتطوير طرق تعتمد على كشف DNA المكورات السحائية من عينات الـCSF،الدم وأي عينات سريرية اخرى ومنها طريقة تفاعل البوليمر المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) اذ تتلخص فائدتها الرئيسية بأنها تسمح لكشف بكتريا *N. meningitidis* من العينات السريرية التي لا يمكن الكشف فيها عن البكتريا بطريقة الزرع وبالذات عند تعاطي المريض

المضادات الحيوية قبل الحصول على العينة للزرع ، وحتى في حالة كون البكتريا فاقدة لحياتها بعد المعالجة بالمضادات فأن الـPCR لم يزل يستطيع كشف DNA البكتريا ، وبسبب شدة المرض بالمكورات السحائية فمن الحاجة الملّحة معالجة المريض في أقرب وقت حالما يتم الشك بالعدوى وأن لا يتم التأخر للحصول على نتائج المختبر او الزرع (Mothershed *et al.*, 2004) .

ان الدراسات المُجرآة في العراق حول هذا الموضوع قليلة وخصوصا عن البكتريا *N.meningitidis* والكشف عنها بطريقة الـPCR فمن هنا جاءت دراستنا والتي تهدف الى تحديد الطريقة الأسرع والأمثل في تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF والدم ويتم تحقيق ذلك من خلال المحاور التالية:

* محاولة عزل وتشخيص بكتريا *N. meningitidis* بطريقة الزرع على الأوساط الاختيارية لعينات الـCSF والدم ، وبطريقة اختبار التلازن لعينات الـCSF ،و بطريقة تفاعل البوليمر المتسلسل لعينات الـCSF والدم.

*امكانية استخدام عينات الدم بدل عينات السائل النخاعي الشوكي في تشخيص البكتريا.

الفصل الثاني

استعـراض المراجـع

Literatures Review

استعراض المراجع Literatures Review

1-2 لمحة تاريخية Historical view

لقد تم وصف مرض التهاب السحايا في النصوص القديمة ، فوصفه ابو الطب ابُقراط في عمله وكذلك ابن سينا في كتابه قانون الطب (Patricia ,2001) ، وبدقة اكثر وصفه ابن زُهر في كتابه الاندلس في القرن الثاني عشر(Marten-Organza *et al.*,2002) .

ويعد الطبيب السويسري Gaspard Vieusseus اول من وصف مرض التهاب السحايا بالمكورات السحائية Meningococcal عام 1805 بعد ان سُجل اول تفشي للوباء في جنيف بسويسرا ،وفي عام 1806 وضع الطبيبان الامريكيان Elias Mann و Lothario Danielson اول تقرير عن المرض في الولايات المتحدة ، اما مكتشف بكتريا *Neisseria meningitidis* المسببة لمرض التهاب السحايا فهو اخصائي الامراض والجراثيم النمساوي Anton Weichselbaum بعد ان شخصها في السائل النخاعي الشوكي للمرضى المصابين بالتهاب السحايا عام 1887 واطلق عليها *Neisseria intracellularis* (Ananthanarayan and Paniker ,2009 ; Granoff *et al*.,2008)

وبحلول القرن العشرين(1908) اصبح 75% الى 80% من الاشخاص المصابين بالتهاب السحايا بالمكورات السحائية يموتون من هذا المرض ،الامر الذي دفع العلماء والباحثين لإجراء البحوث والدراسات المتوالية لتقليل فرص الموت ،اذ توفرت القدرة على تمييز بكتريا الـ *Neisseria meningitidis* عن بكتريا *Neisseria gonorrhoeae* وتمييز سلالاتها التعايشية وعزلها من حنجرة الانسان وتوليد المصل المضاد anti-sera ،ففي عام 1906 لاحظ الباحثون امكانية استخدام الخيول لتوليد الاجسام المضادة ضد بكتريا المكورات السحائية وطُوّر الامر من قبل العالم الامريكي Simon Flexner باكتشافه المصل المضاد للمكورات السحائية

عام1913 ،وفي منتصف الاربعينيات(1945) كانت بداية العلاج بالمضادات الحيوية التي ادت الى هبوط واضح في نسب الوفيات ،اذ أُستخدم البنسلينPenicillin لأول مرة لعلاج المرضى من قبل Chester Keefer وأُستعمل الـ Sulfonamids من قبل Francois Schwentker (Cartwright, 2006 ;Rosenstein and Perkins ,2000) .

استطاع فريق من الاطباء العسكريين عام1969 من معهد Walter Reed العسكري للبحث في الولايات المتحدة من تطوير طريقة لتنقية مادة الـ Polysaccharide لبكتريا المكورات السحائية والمسؤولة عن احداث استجابة مناعية في الجسم ضد البكتريا، وبذلك تشكلت قاعدة ثابتة للقاحات عديد السكريد ثنائية التكافؤ(C,A) ورباعية التكافؤ(Y, W135, C, A) المعروفة حالياً(Granoff *et al.*,2008). وبدأ تلقيح مجندي الجيش الامريكي ضد مرض التهاب السحايا بالمكورات السحائية عام1982 بعد عدة حالات تفشي للمرض اثناء حرب فيتنام اواخر الستينات، لكن في عام 1990 كان الشباب في خطر متزايد من الاصابة بالمرض بعد عدة دراسات أُجريت بين طلبة الكليات بين عامي1990و1992 مما دفع اللجنة الاستشارية لممارسة التلقيح The Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) وهي قسم تابع لمراكز السيطرة على المرض(CDC) the Centers for Disease Control and Prevention وذلك عام 2000 بان توصي الجامعات بضرورة اعلام الطلاب وذويهم حول خطورة المرض وضرورة اخذ اللقاح الملائم ، وأجازت ادارة الاغذية والأدوية Food and Drug Administration(FDA) لقاحات اضافية للمرض تسمى لقاحات المكورات السحائية المقترنة تساعد على الحماية ضد اربع من خمس مجاميع مصلية(Y,W135,C,A) الرئيسة المسببة للمرض في المدة 2005-2010،وفي عام2007 اوصت الـACIP بضرورة اجراء تطعيم روتيني

لمرحلة ما قبل المراهقة ضد المرض وبعمر 11و12 سنة كفحص طبي عام (CDC,2007; CDC,2000) .

2-2 نظرة تشريحية لأغلفة السحايا Meninges anatomical view

يتكون الـ Central Nervous System(CNS) من ثلاث تراكيب رئيسية : الدماغ وساق الدماغ والحبل الشوكي ومنه تمتد الاعصاب المحيطية، ويكون الـCNS في العادة معقم لكن متى ما استطاعت البكتريا من العبور له بنجاح فان انتشار العدوى يمكن ان يحدث بسرعة مؤدياً الى التهاب السحايا الواسع الانتشار (Underwood , 2004) .

يمتلك الـ CNS وحدة تركيبية واحدة يكون فيها الدماغ محمي بوساطة عظام الجمجمة والأغلفة الخارجية السحائية المحيطة به (Gray and Fedorko ,1992) . تتألف السحايا من ثلاث طبقات غشائية تحيط بتراكيب الـCNS وهي تسند الدماغ والحبل الشوكي عن طريق السائل النخاعي الشوكي (CSF) وكذلك تقدم دعم للتراكيب الوعائية المرتبطة (Sinnatamby and Last,2006) وهي:

*الأم الجافية Dura mater (مفردها السحاءة الليفية meninx fibrosa) تمثل الجزء الأبعد من السحايا ،اسمها الشائع القاسي (Waugh and Grant ,2010) ومن اسمها نستدل على انها غشاء سميك قاسي مكوّن من الياف الكولاجين الكثيفة ،الى الخارج من الجافية في الجمجمة الطبيعية لا يوجد فراغ بين الجافية وعظام الجمجمة فتكون ملتصقة بالعظام بقوة ،

*الأم العنكبوتية Arachnoid mater (مفردها السحاءة المصليةmeninx serosa) وتقع الى الاسفل من الأم الجافية وعلى اتصال مباشر معها وتستمران معاً في كافة انحاء الجمجمة والعمود الفقري حتى اسفله اذ تندمج وتنتهي هاتان الطبقتان(Mantini ,1989) ، ويمكن ان يطلق عليهما سوية الغمد Theca ويشكل الفراغ الداخل غمدي Intrathecal space

تعبير بديل للحيز تحت العنكبوتية Subarachnoid المملوء بالسائل النخاعي الشوكي الدائر حول الدماغ والحبل الشوكي ،وتمثل العنكبوتية غشاء رقيق نصف شفاف يُخرج شبكة شعيرات رفيعة جدا تسمى الحواجز العنكبوتية Arachnoid trabeculae التي تعبر الحيز تحت العنكبوتي من السطح الداخلي للأم الجافية الى السطح الخارجي للدماغ حيث تقع الأم الحنون (Waugh and Grant ,2010) .

*الأم الحنون Pia mater (مفردها السحاءة الوعائية meninx vasculosa) وتمثل الطبقة الأنحف والأرق من بين طبقات السحايا الثلاثة وتتألف من طبقة احادية الخلايا التي تكسو وتغلف كل تراكيب الـ CNS وتتبع كل انحناءات الدماغ والمخيخ والحبل الشوكي بشكل مباشر (Sinnatamby and Last ,2006).

عندما يخترق الكائن المجهري الجافية الى الحيز تحت الجافية Subdural space فأن الاصابة ستنتشر بسرعة في كل بيئة المخ Cerebral اما الفراغ تحت العنكبوتي فهو فراغ حقيقي يحتوي سائل النخاع الشوكي الذي يجري في تجويف الدماغ Ventrical الى الوعاء القاعدي Basilar Cisterna (Granert *et al.*,2000 ; Anderson *et al.*,2000) ، ويمثل حاجز الدماغ_الدم Blood-Brain Barrier(BBB) مكون تركيبي عالي التخصص تشترك في تكوينه العديد من الخلايا منها الخلايا البطانية Endothelial cells التي تشكل خط الدفاع الامامي لبرانكيما الـ CNS ضد غزو الممرضات ،كذلك تمتلك الشعيرات الدموية لبرانكيما الـCNS ميزتان تنفرد بها ولا تشاركها باقي الاعضاء المحيطية الاخرى وهي : وجود عقد رابطةJunctional complexes ووجود نشاط نقل حويصلي أحتسائي Pinocytotic متناثر موازن بواسطة انظمة نقل عالية التخصص والتي تحدد دخول الجزيئات الكبيرة والأضداد Antibody(AB) والمايكروبات والاصباغ المحمولة بالدم(Zlokovic,2008) .

3-2 فسيولوجية السائل النخاعي الشوكي CSF Physiology

ان السائل النخاعي الشوكي هو سائل صافٍ لا لون له يتشكل بشكل رئيس داخل بطينات الدماغ من قبل نسيج متخصص يدعى الضفائر المشيمية Choroids plexus التي تستقر في البطينين الجانبيين والبطينين الثالث والرابع ،والبطينات في اتصال مباشر بالفراغ تحت العنكبوتي مما يسمح للـCSF للتدفق بحرية حول الـ CNS ،رغم ان معظم الـ CSF ينتجه البطينان الجانبيان فان 25% منه تقريبا ينشأ من مصادر خارج مشيمية تشمل البطانة الشعيرية (الحواجز العنكبوتية) في برانكيما الدماغ ،وهنالك سيطرة عصبية المنشأ على تشكيل الـ CSF اذ يؤدي تنبيه الجهاز الودي الى انقاص انتاج الـ CSF اما تنبيه الاعصاب نظير الودية قد يؤدي الى تضاعف المعدل الطبيعي لإنتاجه وينتج حوالي 20 مل من الـ CSF كل ساعة عند الطفل الطبيعي ويبلغ الحجم الاجمالي للـ CSF حوالي 50 مل عند الرضيع و150 مل عند البالغ ويكون معظمه خارج البطينات(Berhman *et al.*,2000). وهذا الحجم له علاقة بحجم الدماغ والذي يزداد بتقدم العمر اذ يتجدد السائل عدة مرات يومياً ويتغير خمس مرات في اليوم ،ويمتص الـCSF من خلال خلايا خاصة بنفس المعدل في الـ CNS ; (Perkin *et al.* , 2007 Undrwood , 2004)

يشكل الـ CSF مادة ديناميكية نشطة أيضياً لها العديد من الوظائف المهمة اذ تقدم مساعدة تشخيصية لا تقدر بثمن لتقييم ظروف الالتهاب لكل من الدماغ والحبل الشوكي وأغلفة السحايا وكذلك في حالة النزف تحت العنكبوتي السالب بالتصوير الطبقي المحسوب Computed tomography ، ويمكن الحصول على الـ CSF بالسهولة النسبية بوساطة عملية وخز المنطقة القطنية(البزل القطني) Lumber Puncture (LP) ، قد يحصل تماثل في التغيرات الحاصلة لأي مكون من مكونات الـ CSF في الحالات المرضية المختلفة

مما يولد الكثير من الصعوبات لتفسير السبب وتم توحيد مجموعة المتغيرات تحت اسم المعايير الروتينية (أي بمعنى تحديد البروتين ،الالبومين ،السكر ،الكلوبيولينات المناعية ،اللاكتيت ،اختبارات الضد والمستضد للأشخاص المصابين بالعدوى) مما يزيد من حساسية ودقة التشخيص (Brainin *et al.*,2004) بالإضافة الى فحوصات العد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض،الفحص المجهري ،الزرع ، لون العالق وفحوصات اضافية كاختبار اللاتكس Latex وتفاعل البوليمر المتسلسل PCR (Seehusen *et al.*,2003).

4-2 التهاب السحايا Meningitis

1-4-2 تعريف المرض وانواعه The definition and types of disease

يعرف التهاب السحايا بأنه التهاب الاغشية المغلفة للدماغ والحبل الشوكي والتي تعرف باسم السحايا Meninges (Kumar and Clark,2006) والسائل النخاعي الشوكي الدائر حولهما(MFMER ,2007; Thomas *et al.*,2002) ، يمكن ان يتسبب المرض عن أي غزو ممرض ولأنواع عديدة من الاحياء المجهرية لكن بشكل عام المسببات الاكثر شيوعا لالتهاب السحايا هي الاصابات الفايروسية والبكتيرية (Ginsberg,2004).

1-1-4-2 التهاب السحايا الفايروسي Viral meningitis

يعد الاكثر شيوعا ، تسببه عادة الفايروسات المعوية اذ يظهر بشكل اوبئة او حالات معزولة ، يحدث الاجتياح للمرض بشكل اكبر بفايروسات الكوكساكي Coxsackie ، فايروسات الأيكو Echo virus ، فايروس النكاف Mumps ، فايروس الحلأ البسيط Herpies Simplex Virus (HSV) وفايروس العوز المناعي البشريHuman immunodeficiency Virus (HIV) (Colledge *et al.*, 2010) كذلك فايروس Herpes-zoster وفايروسات Epstein-barr (ISDH,2012).

يعد فايروس Echo 9 اكثر مسبب شائع لالتهاب الدماغ بالفايروسات المعوية كما ويشكل فايروس الحلأ بنمطيهHSV1 وHSV2 احد اهم العوامل المسببة لالتهاب السحايا والدماغ الفايروسي اذ ينتقل من خلال الاحتكاك الجسدي او من خلال الاتصال الجنسي وتتواجد اضداد الـHSV1 بمعدل 30% من طلاب الجامعات اما اضداد الـHSV2 فتتواجد لدى 60% من الكهول ذوي المستوى الاجتماعي المنخفض ، تدخل الفايروسات الجهاز اللمفاوي اما عبر الاصابة في الاغشية المخاطية(حصبة ،حصبة المانية ،حماق ،حلأ بسيط) او عبر الانتشار بالطريق الدموي عند اللدغ من قبل بعض الحشرات وفي مكان الدخول تتكاثر الفايروسات ويحملها الدم الى اعضاء متعددة وتتجلى الاصابة هنا بشكل جهازي وتختلف مظاهرها حسب تكاثر الفايروسات في الاعضاء المختلفة ويتبع ذلك ظهور الاعراض والعلامات الدالة على حدوث الغزو للجملة العصبية المركزية اذ يُظهر فحص الدماغ المباشر بالخزعة احتقاناً سحائياً وارتشاحاً بوحيدات النوى ورشاحة لكل من اللمفاويات والخلايا البلازمية تحيط بالأوعية بالإضافة الى النخر النسيجي حول الأوعية (Snell,2003 ; Hay *et al*.,2001).

2-1-4-2 التهاب السحايا البكتيري Bacterial meningitis

ان مرض التهاب السحايا البكتيري مرض حاد Acute او مزمنChronic يهدد الحياة بتأثيره على الجهاز العصبي المركزي وأحد مسبباته بكتريا تُحدث تفاعلات التهابية في الـ CSF، ومعدل الاصابة بهذا المرض عالٍ بين المصابين وقد يتعرض من أُعطي العلاج المناسب وشُفي من الاصابة الى حدوث تأثيرات ومضاعفات عصبية ، فقد أُصيب بها عدد كبير من الاطفال الرضع وغيرهم ثم تركت الاصابة لهم العوق وتشير الدراسات الى ان الاطفال اكثر عرضة من غيرهم للإصابة بالمرض وتتفاوت احتمالية الإصابة بالمرض حسب مناطق الانتشار

(العاني وجماعته ،2006) ويشكل المرض نسبة اصابة لدى الاطفال تصل الى60% (Dhamij and Jnideep ,2006) مع حصول سنوي بواقع ثلاث حالات لكل 100000ساكن في البلدان الصناعية (Saez-Liorens and McCracken, 2003; Hussein and Shafran, 2000) وفي الدول المتقدمة والنامية فأن معدل حدوث المرض والوفيات تكون اعلى(Balganesh *et al*., 2000).

2-4-1-2-1 طرائق الاصابة وأثار المرض Routes of infection &Disease effects

تنجح البكتريا بوصولها الى الجهاز العصبي المركزي بوساطة ثلاث طرائق رئيسية (Underwood ,2004):

*الانتشار المباشر من بؤرة مجاورة للإصابة كالتهاب الجيوب الأنفية او التهاب الأذن الوسطى او لربما اصابات نشأت بالانتشار المباشر من خارج الجسم كما في حالات جروح الرأس المترافقة مع كسور الجمجمة المفتوحة .

*الانتشار عن طريق الدم الذي يمكن ان يظهر كنتيجة لتسمم الدم او صمّات (انسدادات) نتنة ناشئة من العدوى من مكان اخر كما في التهاب شغاف القلب البكتيري Bacterial Endocarditis ، توسع القصبات وذات الرئة .

*الاصابة اثناء العلاج (علاجية المنشأ) ناجمة من دخول الكائنات المجهرية الى السائل النخاعي الشوكي اثناء عملية وخز المنطقة القطنية(LP).

يغلب لالتهاب السحايا البكتيري ان يحدث نتيجة لانتقال البكتريا بوساطة الدم من موقع في الجسم يضم خمجاً موضعياً ،ويحدث تجرثم الدم بصورة سابقة له او يحدثان في الوقت نفسه، ومصدر تجرثم الدم هو استعمار البلعوم الانفي بكتيرياً وقد يحمل المريض البكتريا في بلعومه

الانفي لفترة طويلة قبل ان يحدث لديه التهاب السحايا وغالباً ما يسبق الاصابة انتان فايروسي يؤدي الى حصول تلف نسيجي وضرر للأغشية المخاطية (Berhman *et al.*,2000) . قد يؤدي التهاب السحايا البكتيري الى تأثيرات عصبية دائمية مثل فقدان السمع ، تأخر عقلي ونوبات صرع ،وتحدث التغيرات السلوكية الى حوالي 50% من الباقين على قيد الحياة خصوصاً عند تأخر التشخيص والعلاج(Dubos *et al*., 2008 ; Welinder-Olsson *et al*., 2007)، فضلا عن ذلك تشمل المضاعفات العصبية طويلة الأمد المحتملة شلل العصب القحفي Cranial nerve paralysis ، استسقاء الدماغ (زيادة السائل النخاعي الشوكي في المخ) Hydrocephalus بالإضافة الى ضعف سمعي و بصري ذو تأثير عميق على نمط حياة الباقين على قيد الحياة (Tebruegge and Curtis,2008 ;Failace *et al*., 2005)،حالات التهاب السحايا البكتيري في الغالب تُنسب الى عامل بكتيري وحيد ،مع ذلك الاصابات المختلطة الناتجة عن اشتراك اكثر من نوع بكتيري قد تكون ممكنة (Marchandin *et al*., 2005) .

2-2-1-4-2 عوامل الخطورة لالتهاب السحايا البكتيري Risk factors for bacterial meningitis

العوامل التي قد تزيد من خطر التهاب السحايا البكتيري تشمل كلاً من الكائن المجهري، المضيف والعوامل البيئية ، وتتضمن العيوب المناعية الجوهرية المساهمة بقلة المناعة تجاه ممرض معين وبالتالي الاستعداد للعدوى كلاً من انعدام الطحال Asplenia ونقص البروبردين Properdin وكذلك النقص الحاصل في تكوين الاجسام المضادة والنقص الحاصل في مسار المتمم الطرفي الشائع C3 , C5-9 الذي يتوسط نشاط التحلل المناعي(النشاط المبيد للجراثيم) (Figueroa and Densen ,1991) ، كذلك الاستعمار الجديد او العدوى الحديثة ببكتريا مرضية كبكتريا *Mycoplasma pneumoniae* او اصابة فايروسية كإصابة الاجزاء العليا

للجهاز التنفسي بفايروس الانفلونزا A ، او التماس المباشر مع الافراد الحاملين لمرض اجتياحي ويسهل الازدحام والاحتشاد الأسري على انتقال القطيرات التنفسية الحاوية على البكتريا ، وان امتلاك المرض الباطني المزمن مثل الفشل الكبدي او داء الذئبة الإحمراري الجهازي Systemic Lupus Erythematosis او ورم نخاعي مضاعف Multiple myeloma جميعها عوامل تزيد من خطر وشدة مرض التهاب السحايا (Charles ,2004b; ACIP ,2000) ، فضلاً عن الميل او الاستعداد الوراثي للعائلة تجاه المرض ، جنس الفرد ، الفترة الزمنية من مرحلة الطفولة، تاريخ جرح الرأس وجراحة الدماغ ، الرضاعة الاصطناعية (Tunkel *et al*., 2005) ، وان للتدخين النشط او السلبي تأثير ودوره في اضعاف الجهاز المناعي مما يسهل اصابة الاجزاء العليا للجهاز التنفسي وبالتالي يزيد من تخاطر المرض (Raghunathan *et al*., 2004) ،وان للعِرق والحالة الاجتماعية تأثير في الاستعداد للإصابة حيث وجد ان العِرق الاسود وذوي الحالة الاجتماعية والاقتصادية المنخفضة اكثر تعرضاً للإصابة بالمرض من العِرق الابيض وذوي الحالة الاجتماعية والاقتصادية المترفة بسبب سوء التغذية وظروف السكن والمعيشة الرديئة،ومع ذلك تقلصت هذه الاختلافات في السنوات الاخيرة اذ عُدت معلمات ومؤشرات محتملة للاختلاف الحاصل في عوامل الخطر كالاحتشاد الأسري والتعرض الى دخان التبغ والسكن في المدينة . (Cohn *et al*., 2010)

2-4-1-2-3 انواع البكتريا المسببة لالتهاب السحايا البكتيري

تحدث إصابة الجهاز العصبي المركزي بمجموعة من الاحياء المجهرية وتختلف انواع البكتريا التي تسبب التهاب السحايا البكتيري بحسب المجموعة العمرية ، ففي الاطفال الخُدّج والمواليد الجدد وصولاً الى عمر ثلاثة اشهر فان المسببات المشتركة المألوفة هي B *Streptococci* (subtypes الثالثة التي تستوطن المهبل عادة هي المسبب الرئيسي اثناء

الاسبوع الاول من العمر) ،كذلك البكتريا التي تقطن القناة الهضمية بصورة طبيعية كبكتريا *Escherichia coli* (الحاملة للأنتجين K1) ، اما الاطفال الاكبر سناً يصابون عموماً ببكتريا(meningococcus)*Neisseria meningitidis* و *Streptococcus pneumoniae* (الانماط المصلية 23,18,14,9,6 serotypes) ،اما اولئك بعمر تحت الخمس سنوات فتكون بكتريا (Hib) *Haemophilus influenza* نوع B هي السائدة ; Tunkel *et al*., 2004) Saez-Liorens *et al*.,2003) بالإضافة الى انواع بكتيرية اقل شيوعا كـ *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella* و *Salmonella typhimerium* (Elizabith *et al*.,1998) ، وهناك انواع اخرى من البكتريا غير الشائعة التي يمكن ان تسبب التهاب السحايا مثل بكتريا *Chryseobacterium meningosepticum* اذ تصيب الاشخاص الاصحاء خارج المستشفى وقد عزلت هذه البكتريا من اجهزة التنفس الاصطناعي في المستشفيات وكذلك بعض الاجهزة والمواد الطبية غير المعقمة (Cheng-Hsien *et al*.,2002) ،عُزل جنس اخر من البكتريا التي تسبب التهاب السحايا في الاطفال والبالغين هي *Stenotrophomonas maltophilia* وتسمى ايضا *Pseudomonas maltophilia* اذ اثبتت الدراسات ان هذه البكتريا من الممرضات الحقيقية التي تستوطن المستشفيات(Alonso and Martinez , 2001) .

اوضحت الدراسات على ان حوالي 60% من مجموع حالات التهاب السحايا تظهر بين الاطفال ما بعد فترة الولادة ،وان (80-90)% من الاصابات تسببها انواع البكتريا الممرضة المسببة الاكثر شيوعاً وهي (Hib) *H. influenza* ، *Strept. pneumoniae* و *N. meningitidis* (Edmond *et al*. ,2010 ;Dhamija and Jaideep ,2006) .

يؤثر التهاب السحايا بوساطة المستديمات النزلية نمط b (Hib) بشكل اساسي على الاطفال الصغار السن ، اغلب الحالات تحدث في الاطفال بعمر شهر الى ثلاث سنوات

(Feigin and Pearlman ,2004 ;CDC ,2002) ، وقد ساعد استعمال اللقاحات المقترنة على تخفيض وقوع او حتى الازالة الفعلية لمرض التهاب السحايا بالمستديمات النزلية نمط b المنتشر في بعض البلدان المصنعة (Peltola ,2000; CDC ,2002).

وتعد بكتريا المكورات الرئوية *Strept. pneumoniae* سبب رئيسي لالتهاب السحايا في مرحلة الطفولة في البلدان التي أُستبعد فيها المرض الذي تسببه المستديمات النزلية نمط b عن طريق التلقيح (Melegaro *et al.* , 2006) ، وتشكل ثاني اكثر مسبب متكرر الحدوث ومؤشر لالتهاب السحايا البكتيري القيحي في بعض البلدان الافريقية جنوب الصحراء الكبرى والبلدان الاوربية بعد حالات المكورات السحائية meningococcus (Melegaro *et al.*, 2006 ; Saez-Liorens *et al.*, 2003) .

5-2 بكتريا المكورات السحائية (meningococcus) *N. meningitidis* بوصفها مسبب لالتهاب السحايا

تعد هذه البكتريا المسبب القيادي المؤدي لالتهاب السحايا البكتيري في العديد من مناطق العالم (Pathan *et al.* ,2003; WHO ,2006) .

1-5-2 الصفات العامة

بكتريا سالبة لصبغة غرام بيضوية او كروية الشكل تتراوح اقطارها بين 0.6-0.8 مايكرومتر ،تنتظم بشكل ازواج كروية تتسطح عند الوجهين المتلاصقين (Ananthanarayan and Paniker ,2009) تمتاز بكونها تنمو تحت ظروف هوائية ،غير مكونة للأبواغ Spores، عديمة الاسواط ، غير متحركة وموجبة لكل من فحصي الـ Catalase والـ Oxidase واغلب سلالاتها تكون محاطة بمحفظة Capsule مما يجعلها اكثر ضراوة من السلالات غير الحاوية عليها(Ala'Aldeen and Turner ,2006)،وهي من البكتريا الشائعة في البلعوم

الأنفي والفمي عند الانسان اذ يمثلان بيئتها الطبيعية (Deeudom ,2007) ، ولم يتم عزلها من الحيوانات او من مصادر بيئية حيث تقدر نسبة الحمل الانفي البلعومي بحوالي 2-5% عند الكهول وهي سريعة الموت وتنمو في بيئة رطبة بدرجة حرارة 35-37 مْ في جو يحتوي 5% CO2 ،وهي مخمرة للكلوكوز والمالتوز وغير قابلة على تخمير السكروز اواللاكتوز (الدو ، 2004) .

تتصف بكتريا *N. meningitidis* كبقية البكتريا السالبة لصبغة غرام بكونها محاطة بغشاء خارجي مكون من اللبيدات Lipids ، بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins(OMPs) ومادة عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS)، المكورات السحائية الممرضة تغلف بوساطة محفظة عديدة السكريد مرتبطة بهذا الغشاء الخارجي(Caugant ,1998) .

2-5-2 تصنيف بكتريا *N. meningitidis*

قسمت البكتريا على 13 مجموعة مصلية serogroup (A، B، C، E29، H، I، K، L، M، W135، X، Y، Z) بالاستناد الى التركيب والخصائص المستضدية للمحفظة العديدة السكريد وأكثر الاصابات سببها البكتريا العائدة للمجاميع المصلية الخمسة (A،B،C،Y،W135) (Anderson *et al*., 2004) ، وأخيراً اضيفت المجموعة المصلية X (Boisier *et al*., 2007) الى المجاميع المصلية الخمسة الاخرى التي تملك امكانية مرضية ومسببة اكثر من90% من المرض المنتشر حول العالم (Stephens, 2007).

وهنالك تصنيف اخر يعتمد على بروتينات الغشاء الخارجي من الفئة 1 (porA) ،ومن الفئة 2 او3 (porB) وبنية قليل السكريد الشحمي على التوالي (Stephens, 2009).

ويوضح الجدول (2-1) التصنيف المصلي لبكتريا الـ *N. meningitidis* اعتماداً على مكونات الغشاء الخارجي بوصفها تراكيب مستضدية (Manchanda *et al*.,2006).

جدول (2-1) تصنيف بكتريا *N. meningitidis* مصلياً (Manchanda *et al*.,2006)

اساس التقسيم	الوظيفة	نظام التصنيف	عدد المجموعات	الاسماء
المحفظة	تحمي ضد نظام المتمم المُعتمد في التحلل البكتيري وعملية البلعمة .	مجاميع مصلية serogroups	13	A,B,C,E29,H,I,Z,K, L,M,W135,X,Y
بروتينات الغشاء الخارجي porins	تخلق ثقوب صغيرة من خلالها تستطيع المواد الهيدروفيلية الذائبة العبور،اختيار الايونات الموجبة او السالبة .			
-الصنف1 (porA)		Sub serotypes	10	p1.1,p1.2,p1.3…..
-الصنف2و3 (porB)		Serotypes	20	1,2a,2b,……..21
قليل السكريد الشحمي LOS	له نشاط immunotoxic فعال .	immunotypes	13	L1,L2,……L13
الهلبpili	يعزز بداية الالتصاق الاولي الى الخلايا الظهارية والبطانية وكريات الدم الحمراء .	–	2	I,II

تصنف بكتريا *N. meningitidis* (Vasanthakumari ,2007) كما يلي :

Kingdom :Bacteria

Phylum :proteobacteria

Class :Beta proteobacteria

Order :Neisseriales

Family :Neisseriaceae

Genus :*Neisseria*

Species :*Neisseria meningitidis*

اذ يضم جنس النايسيريا على الاقل 25 نوع species اعتماداً على معلومات تتابع الجين *16s rRNA* (Hung and Christodoulides , 2013) ، وان اكثرها اهمية من الناحية الطبية نوعان رئيسيان هما : بكتريا المكورات السحائية *N. meningitidis* (meningococcus) وبكتريا السيلان *N. gonorrhoeae* (gonococcus) (Madigan and Martinko,2006) ، ويمكن عدّ بكتريا المكورات السحائية ممرض خطير له القابلية على احداث الاصابة عند توفر الظروف الملائمة بسبب تواجدها مع المستنبت الطبيعي Normal flora للأجزاء العليا للجهاز التنفسي ،اذ يقدر تقريبا(5-10)% من المجتمع البشري يحمل البكتريا كجزء من النبيت الطبيعي للبلعوم الانفي (Johston *et al*., 2004) .

3-5-2 امراضية بكتريا المكورات السحائية Pathogenecity of meningococcus

تعد البكتريا سبباً مهماً للإمراضية وللموت حول العالم(Van Deuren *et al*., 2000)، ويمكن تلخيص حالة الإمراضية على انها قدرة البكتريا على مقاومة الوسائل الدفاعية للمضيف ومن اهمها عمل الخلايا الملتهمة للقيام بعملية الالتهام او البلعمة Phagocytosis حيث تقاوم البكتريا هذه العملية من خلال وجود مركبات سطحية مختلفة كالمحفظة وبعض المركبات البروتينية على سطح الخلية ،ومن ابرز العوامل التي تمكن البكتريا الممرضة من التعبير عن

نشاطها هو قابلية التصاقها بالمضيف (انسجة المضيف) من خلال ما تمتلكها من شعيرات Pili وبالتالي تكون دائمة الالتصاق بالمضيف وقادرة على انتاج وتحرير العوامل (السموم و الانزيمات) المرتبطة بالتعبير عن حالة المرض كمياً(Greenwood *et al*.,2007).

سميت بكتريا *N. meningitidis* بهذا الاسم لأنها تسبب التهاب اغشية السحايا الحاد Meningitis اذ يتميز المرض بكونه التهاب سحائي قيحي مع بداية مفاجئة لصداع ،حمى وتصلب الرقبة (Rosenstein *et al*.,2001) ،بالإضافة الى ذلك ينتج عن استقرار البكتريا في المجرى الدموي تجرثم الدم Bacteremia ، ومن ثم انتان الدم بالمكورات السحائية Meningococcemia (Septicemia) وتسممه Meningococcal sepsis الذي يمكن تمييزه من خلال ظهور طفح جلدي مع حمى وقشعريرة وفتور وتوعك ،الحالة المتطورة من المرض (مع او بدون التهاب السحايا) تتميز بارتباط مرضي متعدد (حصول فشل عضوي متعدد مرتبط بالالتهابات الجهازية) ونسبة موت عالية (Todar ,2006).

قد يتوافق حدوث تداخل سريري لمتلازمتي التهاب السحايا وتجرثم الدم بشكل آني متزامن لكن التهاب السحايا لوحده يحدث كثيراً جداً(WHO ,2003) ،تستطيع ان تسبب البكتريا وبالذات المجموعة المصلية Yعرضياً مرض ذات الرئة او مشاكل تنفسية اخرى (Racoosin *et al*.,1998) لكنها غير شائعة لبكتريا المكورات السحائية اذ تحدث عموماً للمرضى المسنين او لمرضى نقص المناعة ،وتسبب البكتريا العديد من الامراض النقيلية Metastatic كالتهاب المفاصل والتهاب غشاء التامور Pericarditis الذي يمكن ان يتطور وتسببه المجموعة المصلية C ،وتظهر البكتريا بشكل واضح في حالة الاصابة بالتهاب التامور الذي يحدث في الايام القليلة الاولى من مرض التهاب السحايا بالمكورات السحائية لكنها لا تظهر عند حصوله متأخر بعد اسبوع واحد او اسبوعين بعد الاصابة ،تسبب البكتريا كذلك التهاب باطن العين،

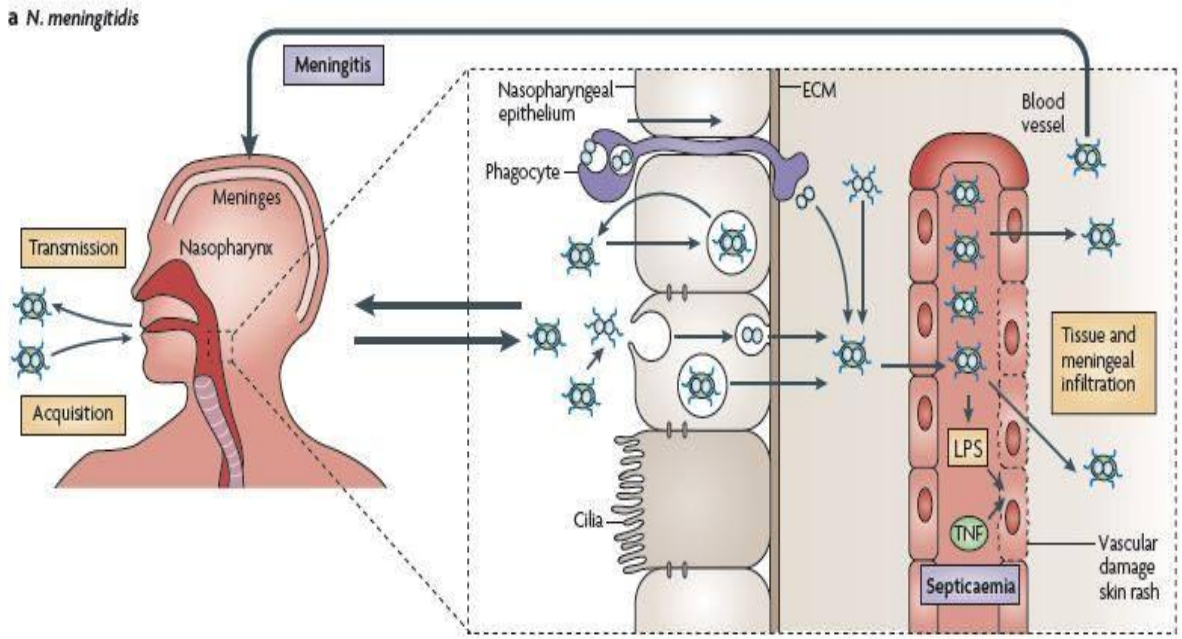
التهاب الغدد اللعابية ،التهاب الاعضاء الملحقة وداء الالتهاب الحوضي ،اصابات المكورات السحائية لمنافذ الهواء العلوية او السفلى كالأعضاء التناسلية والشرج تختلف عن المرض الإجتياحي المنتشر كونها تتطور بدون تجرثم سابق للدم (Manchanda *et al*. 2006) .

4-5-2 طريقة الاصابة بالبكتريا وخطوات حدوث المرض Route of infection & disease steps

تعد السطوح المخاطية لمنطقة البلعوم الانفي للإنسان المستودع الطبيعي الوحيد لبكتريا المكورات السحائية والتي تتواجد في اغلب الاحيان بشكل كامن خلف الحنجرة ،وتنتقل البكتريا من شخص لآخر بالاتصال المباشر او عن طريق القطيرات التنفسية ،خلال فترات العدوى المستوطنة يحمل البالغونCarrier سلالات البكتريا والتي اغلبها غير مرضية في منطقة البلعوم الانفي بدون اعراض ومن النادر ان تنتشر الاصابة (Manchanda *et al*., 2006 ; Claus *et al*.,2005) ، ويؤدي استعمار البلعوم الانفي بالسحائيات ذات المجاميع المصلية المسؤولة عن معظم حالات التهاب السحايا الى حدوث حالة الحمل اللاعرضية للمرض وقد يستمر هذا الاستعمار لعدة اسابيع او اشهر ويتم تسهيل عملية الاستعمار هذه من خلال التهرب من جهاز المناعة عن طريق افرازها لانزيم Protease IgA الذي يشطر الـ IgA الافرازي مما يجعله فاقداً لوظيفته (Mistry and Stockley ,2006 ; Berhman *et al*.,2000).

ان التصاق البكتريا بواسطة الاهلاب (الشعيرات) بمستقبلات الخلايا الظهارية العمودية غير المهدبة في البلعوم الانفي هي اول خطوة للإصابة بالمرض اذ تدخل البكتريا الى الخلايا عبر الية الأخذ الخلوي Endocytosis وتتكاثر المكورات السحائية عقب عملية الالتصاق على سطح الخلايا البطانية وتشكل مستعمرات صغيرة وبمقدور البكتريا عندئذ ان تعبر السطوح المخاطية وتدخل مجرى الدم وتسبب العدوى الجهازية اذ تساعد المحافظ الكبيرة الحجم على نجاة

البكتريا عند عبورها في الدم وتحميها من البلعمة وهذا ما يزيد فوعتها ،وبمجرد الوصول الى مجرى الدم فإن بإمكانها ان تتكاثر بسرعة بمعدلات عالية عند غياب الضد المصلي النوعي الذي يعمل بالاشتراك مع المتمم على حصر انتشار البكتريا ،او في حالة وجود عيب خلقي في اليات البلعمة والدفاع عند الثوي كغياب الاضداد من الصنف IgM وIgG ،او نقص في وظيفة الطحال او استئصاله ،وقد ينتقل ايضا هذا العامل الممرض من مكان لآخر عبر حاجز الدم السحائي ليصيب السحايا ويسبب التهابها(Berhman *et al*.,2000)(منظمة الصحة العالمية ،2011) . وكما هو مبين في الشكل (2-1) (Virji , 2009).



شكل(2-1) مراحل النشوء المرضي لبكتريا *Neisseria meningitidis* (Virji , 2009)

ان الطريق الذي تنتشر من خلاله المكورات السحائية من منطقة البلعوم الانفي الى اغلفة السحايا قد يكون (Ananthanarayan and Paniker ,2009):

*مباشرة على طول الغمد المحيط بالعصب الشمي.

*خلال الصفيحة المصفوية الشكل Cribriform الى الفراغ تحت العنكبوتي.

*الاحتمال الاكثر من خلال المجرى الدموي.

*في بعض الحالات موقع دخول المكورات السحائية قد يكون الملتحمة Conjunctiva وتحصل حالات الرمد القيحي بالمكورات السحائية ، وحال وصولها الى الجهاز العصبي المركزي تنشأ جروح وأضرار قيحية لأغلفة السحايا تتضمن سطح الحبل الشوكي بالإضافة الى قاعدة وقشرة الدماغ ،وتتواجد المكورات دائما في الـ CSF بحالتيها الحرة وضمن كريات الدم البيض Leucocyte .

ويلاحظ حصول ارتفاع للبروتين في الـ CSF بسبب زيادة النفوذية الوعائية للحاجز الدموي الدماغي(BBB) وتسرب السائل الغني بالألبومين من الاوعية الشعرية والأوردة ، ويعود نقص السكر في الـ CSF الى نقص قدرة النسيج الدماغي على نقل السكر (Berhman *et al*., 2000) .

تسبب المكورات السحائية في الدم استجابة قوية للالتهاب تقترن بتفعيل الشلالات المتممة والمساعدة على التخثر ،وان مادة قليل السكريد الشحمي Lipo-oligosaccharide (LOS) المحفزة الرئيسية للاستجابة لالتهاب الخلايا هي مادة اساسية Endotoxin للإصابة بمرض المكورات السحائية ، ويؤدي افراز السايتوكينات المختلفة بفعل الـ LOS مثل: [Tumer necrosis factor- α (TNF- α) وعامل نخرة الورم Interleukin-1 (IL-1)] وأنواع الاوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species(ROS) و أوكسيد النتريك Nitric Oxide(NO) المتحرر من خلايا الـ Macrophages الساكنة في نسيج البلعوم الانفي الغني بالخلايا البلعمية وحيدة النواة الى تلف بطانة الاوعية الدموية وبالاقتران مع امكانية نخر الانسجة الطرفية لاحقاً وتعطل العديد من اجهزة الجسم اذ تعد السمة المميزة لمرض الالتهاب بالمكورات السحائية المنتشر هو نزف الجلد (الطفح الحبري او الفرفري) الذي لا يبيض عند

ضغطه ويظهر بسرعة في أي جزء من الجسم كراحة اليد وأخمص القدم ،ان نشوء الجروح هو انعكاس للالتهاب الوعائي المبرمج الحاصل من قبل الـ Endotoxin (LOS) والسايتوكينات والذي تتوسطه جزيئات الالتصاق عالية التنظيم على بطانة الاوعية الدموية والخلايا العدلة المنشطة بزوال الحبيبات ،وتبين ان ثمة ارتباط بين مستويات افراز الـ LOS ومعدل الوفيات الناجمة من الاصابة بمرض التهاب السحايا بالمكورات السحائية (Stephens ,2009 ; Anjum *et al*.,2002; Van Deuren *et al*.,2000) .

2-5-5 الاعراض والعلامات السريرية للمرض Clinical symptoms & Signs

يوجد نمطان مسيطران في بداية التهاب السحايا بالمكورات السحائية هما (Berhman *et al*., 2000) :

A- النموذج الحاد :النموذج الاكثر دراماتيكية والأقل شيوعاً لحسن الحظ يتمثل بالبداية المفاجئة مع علامات مُترقية على نحو سريع من الصدمة والطفح الجلدي والتخثر المنتشر داخل الاوعية وغياب الوعي وكثيراً ما يتطور الامر نحو الموت في غضون 24 ساعة .

B- النموذج الشائع :تتجلى الصورة الاكثر شيوعاً بكونها مسبوقة قبل عدة ايام بأعراض في السبيل التنفسي العلوي او اعراض معدّية معوية ثم يليها ظهور علامات لا نوعية لخمج الجهاز العصبي المركزي كالتهيج العصبي والتعب .

عادة ما تظهر اعراض الاصابة بالمكورات السحائية الغزوي Invasive Meningococcal Disease (IMD) في غضون مدة تتراوح بين يوم واحد و اربعة ايام بعد الاصابة بعدواه ،اذ تشمل الاعراض الاكثر شيوعاً لغرض التشخيص الاولي لـ IMD كلاً من الحمى المفاجئة ،التقيؤ ،الصلابة القفوية المتمثلة بعدم القدرة على ثني الرقبة الى الامام بشكل

سلبي بسبب زيادة توتر عضلة الرقبة وتيبسها ، والطفح الجلدي وتغير الحالة النفسية (van de Beek *et al*.,2004;Forbes *et al*.,2002) ،وتتنوع الاعراض والعلامات السريرية للمرض اعتماداً على العمر ،فبوادر اصابة الرضّع والأطفال بالـ IMD تظهر كبداية بطيئة وتشمل التهيج العصبي ،الخمول ،الغثيان ، فقدان الشهية ، الميل الى النوم وظهور التشنجات اذ تتقلص العضلات بشكل مفاجئ وعنيف لا يمكن السيطرة عليه ، وعلامات خاصة تدل على التهيج السحائي كارتفاع الضغط داخل القحف وانتفاخ اليافوخ الامامي (Bonab *et al* , 2012 ; Prober ,2004) اما اعراض المرض في الاطفال الأكبر سناً والبالغين فهي تهيج سحائي كتصلب الرقبة ،الم الظهر ،صعوبة الرؤية في الضوء الساطع ،رهاب الصوت (قلة التحمل للضجيج والصوت المرتفع)،صداع ،ضعف الوعي ،وتشمل العلامات او المؤشرات السريرية الاخرى التي تشير الى الحالة المرضية السحائية علامة كيرنيغ Kernig sign (ثني الورك بمقدار 90 درجة مع ألم يترافق مع بسط الساق) او علامة برودزنيسكي Brudzinski sign (الثني اللاإرادي للركبتين والورك بعد الثني المتصل للرقبة والمريض بوضعية الاستلقاء) قد لا تكون العلامتان السابقتان واضحتين لأن حساسية الاختبار محدودة لكنها تقدم تشخيص جيد لالتهاب السحايا اذ لا تشاهد هذه العلامات او تكون نادرة في الامراض الاخرى (Berkley *et al*., 2004 ; Patricia, 2001). يشكل 15-18% من الاطفال الذين يصابون بحالة صرع وحمى دلالة على اصابتهم بالتهاب السحايا الحاد(Appleton *et al* .,2000) ، وهناك اعراض اخرى لا نوعية لالتهاب السحايا يتشارك بها مع الامراض الجهازية الاخرى اهمها اعراض القناة التنفسية العليا كسيلان الانف والسعال ،آلام عضلية ومفصلية ،برودة الاطراف، علامات جلدية مختلفة كتلّون الجلد بلون غير طبيعي ،ارتفاع ضغط الدم مع بطء القلب او

بالعكس ،كذلك اضطرابات تنفسية ،شلل العصب المُبعّد والعصب المحرك للعين وذهول وغيبوبة .(Charles ,2004b ;Theilen *et al*.,2008)

تشمل علامات انتان الدم Meningococcemia بداية مفاجئة للحمى وطفح جلدي حبري اللون وتتضمن دورة الاعراض السريرية انخفاض ضغط الدم ونزف كظري حاد وكذلك فشل عضوي متعدد والصدمة ثم الموت ،و غالباً ما يستجيب مرضى الانتان الدموي الحاد للعلاج بشكل سيء وقد يظهر الموت خلال ساعات من بداية المرض(Cohn *et al*.,2010).

6-5-2 عوامل الضراوة Virulence Factors

يمكن تعريف عوامل الضراوة بأنها تلك المكونات البكتيرية التي لها القابلية على احداث الضرر للمضيف الحساس سريع التأثر(Casadevall and Pirofaski ,2009) ،وتعد عوامل الضراوة (VFs) من الامور المثيرة للاهتمام الشديد وذلك لان مقدرة الممرضات الناجحة على احداث الاصابة و احداث المرض والبقاء في بيئة المضيف تكون مدعمة بمجموعة كبيرة من ميكانيكيات الفوعة الواقعة اما على سطح الخلية البكتيرية او المتحررة الى الوسط الخلوي الخارجي او المحقونة مباشرة الى خلايا المضيف ،كذلك تتفاعل العديد من الـ VFs المهمة مع خلايا المضيف وبالتالي تحوّر من وظيفتها (Chen *et al*.,2011) .

تمتلك بكتريا المكورات السحائية *N. meningitidis* العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من تجنب جهاز المناعة وإحداث الحالات المرضية (Persson *et al*.,2001) وفيما يأتي اهمها:

1-6-5-2 المحفظة Capsule

عبارة عن طبقة خارجية متميزة تحيط بالجدار الخلوي للبكتريا ،تتكون من مادة عديد السكريد التي تنتظم بشكل بوليمرات متجانسة Homopolymer او متباينة Heteropolymer

مؤلفة من وحدات متكررة للسكريات الاحادية والكليسرول او سكريات ثنائية او من السكريات الثلاثية (Garrity *et al*., 2005) ،وظيفتها الاساسية اعاقة عملية البلعمة Phagocytosis والتهرب من الجهاز المناعي للمضيف وبالتالي تسهيل انتقال واستعمار وبقاء البكتريا في المضيف (Stephens *et al*., 2007) ، وكذلك تحدّ من ارتباط الجزيئة C3 مع البكتريا عن طريق تغطية مستقبلاتها الخاصة او قد تغير موقع الارتباط الى مواقع اقل فعالية على الجدار الخلوي البكتيري وبذلك تحدد تكوين معقد استهداف الجدار البكتيري(Lewis *et al*.,2008).

ولان بكتريا المكورات السحائية لا تعيش سوى في منطقة البلعوم الانفي للإنسان ماعدا بعض الوقت قد تقضيه البكتريا خارج المضيف قبل الوصول للمضيف الجديد فتؤدي المحفظة بذلك دور الحماية من الجفاف(Katz ,2010).

تعتمد المجاميع المصلية serogroups لبكتريا المكورات السحائية على الاختلافات المستضدية Antigenic لمادة عديد السكريد المحفظي اذ تمتلك البكتريا 13 مجموعة مصلية محفظية(Frasch ,1989) .

2-6-5-2 الذيفانات Toxins

ان السمية Toxigenicity او ما يعرف بإنتاج السمومToxogenesis هي ميكانيكية تتمكن بواسطتها البكتريا من احداث المرض اذ تمتلك البكتريا الممرضة صنفين من السموم هما السموم الداخلية Endotoxins والسموم الخارجية Exotoxins ،تمثل السموم الداخلية مركبات الخلية الموجودة في الجدار الخلوي اذ ترتبط هذه السموم الداخلية المنشأ بصورة ثابتة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام وهي لا تفرز من قبل الخلايا وتبقى داخل الخلية ولا تتواجد في الوسط المحيط،يمكن تحررها فقط اما بواسطة تحلل الخلايا او عن طريق تحطيم الخلايا او هضمها .(Todar,2008)

اما السموم الخارجية فتمثل البروتينات الذائبة التي تفرز من البكتريا خلال النمو وكنواتج اثناء النشاطات الخلوية الأيضية ،وان البعض منها غالباً ما تعمل او تنشط في موقع الاصابة وتلعب دور مهم في عملية الاختراق وتنتج معظمها من قبل البكتريا الموجبة لصبغة غرام والقليل من انواع البكتريا السالبة لصبغة غرام (Todar,2002) .

لا تنتج بكتريا *N. meningitidis* سموماً خارجية لكنها تمتلك سموم داخلية تتواجد في جدار الخلية (Todar,2006) متمثلة بـ:

***متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS)**

يعد المكون الاساسي للغشاء الخارجي ومحفزاً قوياً للمناعة الطبيعية في المضيف ويتحرر عند تحطيم البكتريا او بعد موتها وهو عبارة عن معقد من جزيئات مقاومة للحرارة (Leone *et al*.,2007) اذ تتحلل البكتريا نتيجة للوسائل الدفاعية للمضيف Host defense مثل الأنزيم الحالLysozyme او نتيجة فعالية الأضداد الرئيسية المتخصصة او نتيجة استخدام المضادات الحيوية (Todar,2008) ،ويتكون الـ LPS (معقد السم الداخلي) من ثلاث مناطق وفق ما جاء في Raetz وجماعته(2007) وهي:

1- منطقة الشحم A Lipid A region

2- منطقة اللب Core region

3- السلسلة الجانبية O-side chain

تُظهر الجزيئة المماثلة في الانواع المرضية لبكتريا المكورات السحائية تباين كبير في تركيب معقد السم الداخلي اذ يفتقر الى مكررات السلسة الجانبية O-side chain والتي تسمى ايضاً بالمستضد الجسمي Somatic O-antigen O التي ترتبط بالشحم A عن طريق منطقة

اللب لذلك يطلق عليها اصطلاح قليل السكريد الشحمي(LOS) Lipo-oligosaccharide (Yamasaki *etal.*,1994)

ان تركيب طبقة الـ(LOS) البكتيرية قد تكون مشابهة لطبقة اللبيدات السكرية الموجودة في الانسان مما يشكل تمويه للجهاز المناعي للإنسان فلا يستطيع تمييز البكتريا (Persson *et al.*,2001) ،وتحرر بكتريا المكورات السحائية كميات كبيرة من الـ(LOS) الفعالة عبر تكوين الفقاعات او عند تحللها (Song *et al* ., 2000 **;** Poltorak *et al.*,2000) .

ان اهم التأثيرات الرئيسة الناتجة عن السم الداخلي هو قدرته على احداث الحمى ،زيادة عدد كريات الدم البيضاء فوق العدد الطبيعي ،حث العامل المتمم ،انخفاض ضغط الدم، حث المقاومة غير النوعية للإصابة ،حث حالة مقاومة العلاج ضد توليد الحمى الناتجة عنه، تنشيط خلايا البلعم الكبير وحث تكوين الإنترفيرون Interferon (العزاوي،2009).

2-5-6-3 الأهلاب (الشعيرات) Pili(Fimbria)

لاستعمار خلايا المضيف بنجاح ،تحتاج بكتريا المكورات السحائية الى توثيق الرابطة مع سطوح خلايا المضيف ،يحصل الاتصال الاول من خلال عملية الالتصاق بسطوح الخلايا الظهارية غير المهدبة والمعتمدة على تداخل جزيئات خاصة من على سطح البكتريا Adhesion مع مستقبلات Receptors خاصة كائنة على سطوح اغشية خلايا المضيف ،أي ان الاستعمار يتضمن عمليات الالتصاق ثم التجمع البكتيري وتكوين المستعمرات Microcolony وتشكيل الغشاء الحيويBiofilm ثم تجنب جهاز المناعة ،وتعد الأهلاب من عوامل الاستعمار الضرورية لإمكانية البكتريا على الاصابة وإحداث المرض (Hung and Christadoulides ,2013).

ان الأهلاب هي عبارة عن تراكيب خيطية شبيهة بالشعرة ذات الياف مرنة حلزونية الشكل قطرها 6 نانومتر وتنبثق الى خارج سطح البكتريا لعدة مايكرومترات (Nassif *et al*. 1994,) ويتكون الهلب من صفوف منتظمة من الوحدات الثانوية لبروتين الـ Pilin الذي يبلغ وزنه الجزيئي بحدود 16-22 كيلو دالتون وهي المسئولة عن وظيفته في الالتصاق وكعامل ضراوة (Garitty *et al*.,2005) .

يحصل الالتهاب نتيجة ارتباط الأهلاب مع الشرايين في منطقة الجلد مؤدياً الى حدوث ضرر وعائي وظهور نزف جلدي بينما البكتريا غير الحاوية على الأهلاب لا تؤدي لحدوث الالتهاب(Hung and Christadoulides ,2013) .

2-5-6-4 الانزيم الحال للبروتينات Protease

تؤدي البروتينات الخارجية Exoproteins دوراً رئيساً في امراضية العديد من انواع البكتريا السالبة لصبغة غرام ،وتؤدي بروتينات المكورات السحائية الافرازية Meningococcal secreted proteins (MSPs) دوراً مركزياً في تحوير جينات خلايا المضيف فضلاً عن انها تساهم في احداث الالتهاب والموت الخلوي المبرمج Apoptosis (Robinson *et al*.,2004).

إن الكلوبيولين المناعي IgA يمنع التصاق البكتريا بالانسجة المستهدفة ويزداد معدل تركيز هذا الكلوبيولين الممنع بتقدم العمر ببطئ منذ الولادة ، تفرز بكتريا المكورات السحائية بروتينات من صنف Auto transporters ويمثل انزيم Protease IgA احد هذه البروتينات المفرزة (Lomholt *et al*.,1995) وهو من الانزيمات الخارج خلوية والذي يُنتج ويُفرز على امتداد مدة نمو البكتريا بمعدل متزايد اذ يعمل على فلق ومنع نشوء الجسم المضاد من صنف Immunoglobulin Alpha (IgA) في الانسان وبالتحديد الصنف الثانوي IgA1

المخصص لمهاجمة بروتين الغشاء الخارجي porA لبكتريا المكورات السحائية مؤدياً الى تغيير التأثير المتبادل بين البكتريا والأنسجة الطلائية (Garitty *et al.* ,2005) .

5-6-5-2 بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins (OMPs)

يتألف الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة غرام من غشاءين هما الغشاء الداخلي والغشاء الخارجي يفصلهما منطقة البلازما المحيطية Periplasma الحاوية على طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan ،ويمتلك الغشاء الخارجي اهمية طبية من حيث كونه حاجزاً ذا نفاذية اختيارية يحمي البكتريا من المواد الكيميائية المؤثرة على طبقة الببتيدوكلايكان كالمضادات الحيوية وأهمها مجموعة البنسلين وكذلك الانزيمات مثل الخميرة الحالة Lysozyme ويمنع دخول مثل هذه المواد ومهاجمتها لطبقة الببتيدوكلايكان (Stork *et al.* , 2010; Reddy , 2010) وكما هو معروف فانه يتألف من متعدد السكريد الشحمي LPS وعدد من البروتينات فضلاً عن الدهون المفسفرة Phospholipids (Brooks *et al.* ,2004).

تتمثل البروتينات التركيبية الاساسية للغشاء الخارجي لبكتريا المكورات السحائية بأنواع من البروتينات تم تصنيفها في خمسة اصناف رئيسة اذ استخدمت جميعها كلقاحات (Chiou *et al.*, 2006) ، وتؤدي ادواراً في عمليات الالتصاق والاستعمار والغزو البكتيري وهي المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية وتعزيز الاتصالات الحاصلة بين الخلايا (Wu *et al.*, 2008) .

7-5-2 وبائية بكتريا المكورات السحائية Epidemiology of *N. meningitides*

على الرغم من النجاح الكبير في تطوير الادوية وتوفر اللقاحات الفعالة ،لا تزال مشكلة الاصابة ببكتريا *N. meningitidis* تمثل تهديد خطير للصحة عالمياً (Mllonovich , 2007) ، وبما ان منطقة البلعوم الانفي للإنسان هي المستودع الطبيعي الوحيد لبكتريا

المكورات السحائية اذ يكون الشخص حامل لها دون ان تظهر عليه اعراض المرض وتحصل عملية انتقال البكتريا من خلال القطيرات التنفسية المحمولة بالهواء ،فخلال الفترات الوبائية يكون معدل الأشخاص الحاملين للبكتريا حوالي 5-10% وأي زيادة في نسبة الحاملين فذلك ينذر ببداية ظهور الوباء Epidemic اذ تصل النسبة في المجتمعات المغلقة الى 90% (Ananthanaryan and Paniker , 2009).

يلاحظ ان بعض الاوبئة تكون من النوع المستوطن Endemic اذ يتعرض الناس للإصابة بمرض التهاب السحايا على مدار السنة ويصيب اعداد كثيرة من السكان وقد يظهر على شكل اوبئة دورية Periodic او قد يظهر في اوقات مختلفة في المناطق الاخرى (Nicolas *et al*., 2005) ،ويتفاوت نطاق الوبائية واحتمال الاصابة بالمرض بشكل ثابت حسب مناطق الانتشار كالسفر الدولي المتزايد والهجرة عبر الحدود (WHO, 2006) ، وحسب الوقت اذ يظهر المرض على طول السنة لكن تبلغ ذروة حدوث الاصابة في نهاية الشتاء وأوائل الربيع (Rosenstein *et al*., 2001) ،ويؤثر المناخ ايضاً على ظهور الوبائية بشكل دوري عادةً في موسم الجفاف اذ تساعد الليالي الباردة والرياح المغبرة على زيادة انتشار اصابات القناة التنفسية العليا ،وكذلك يعد الازدحام الحاصل في السجون ومساكن الطلبة والمجندين في الجيش والهجرة السكانية الموسمية عوامل مساعدة على حدوث الوبائية (WHO,2011;WHO, 2010a) والاختلاف في طرائق المعيشة الاجتماعية والاقتصادية(Manchanda *et al*.,2006)

تشير الدراسات الى ان الاطفال بأعمار بين ثلاثة اشهر وخمس سنوات هم أكثر عرضة من غيرهم للإصابة بمرض التهاب السحايا (Ananthanaryan and Paniker ,2009) ، وتكون معدلات فتكها على أشدها بين الرضع الذين تتراوح اعمارهم بين ثلاثة اشهر و12شهر

(WHO, 2011)، الذروة الثانية من الاصابة تلاحظ في المراهقين والشباب وتُنتج في تزايد خطر الانتقال وخصوصاً بين طلاب الجامعات(Bilukha and Rosenstein ,2005) .

وجدت دراسة (AL-Kaisi *et al*.,2009) ان وباء التهاب السحايا بالمكورات السحائية قد سُجل في بغداد عام 1966-1967. ويتسبب مرض التهاب السحايا في العراق عن انواع عديدة من البكتريا المرضية تشمل بكتريا *H. Influenza* بنسبة 62% وبكتـريا *Strep. pneumoniae* بنسبة 72% (AL-Sharbeti *et al*.,1991) ،اما بكتريا *N. meningitidis* فشكلت نسبة 80.8% (AL-Kaisi ,1991).

توجد اختلافات واضحة في حالات الاصابة ببكتريا *N. meningitidis* في بلدان العالم تبعاً للمجاميع المصلية المسؤولة عن اكثر من 90% من اصابات مرض السحايا والمتمثلة بالمجاميع المصلية W135,Y,C,B,A (Anderson *et al*.,2004) ،فمرض التهاب السحايا الشديد Severe الذي تسببه المجموعة المصلية A هو الاكثر وقوعاً في البلدان النامية بالذات أفريقيا اذ سُجلت الآلاف من حالات الاصابة وحالات الوفيات في بلدان جنوب الصحراء الكبرى الموبوءة بالمرض والتي أطلق عليها حزام التهاب السحايا Meningitis belt (Trotter and Greenwood,2007) ،فخـلال الموسـم الوبـائي لعـام 2009 (موسـم الجفـاف) تـم تسـجيل 78416 حالة اصابة بالمرض و4053 حالة وفاة في مجموع 14 بلد أفريقي اذ كان الاعلى منذ وباء عام 1996 وتميز بسيطرة المجموعة المصليةA (WHO,2010b , Harrison *et al*.,2009).

في اوربا يتراوح مستوى الاصابة بالمرض بين 0.2 حالة و14حالة لكل 100000نسمة من السكان تسببها سلالات المجموعة المصلية B وكذلك في استراليا ونيوزيلندا يوجد نمط مماثل للإصابة بالمرض ،اما في امريكا فيتراوح مستوى انتشار المرض بين 0.3 حالة و4 حالات لكل

100000 نسمة من السكان، وأمريكا اللاتينية تعزى غالبية حالات الاصابة الى المجموعتين المصلية C,B (Harrison *et al*.,2009) ،اثناء المدة 2005-2011 ظهر ما يقارب 800 الى1200حالة لمرض التهاب السحايا بالمكورات السحائية سنوياً في الولايات المتحدة وتتمثل بواقع حصول 0.3 حالة لكل100000 نسمة من السكان سببتها المجموعة المصلية Y , CDC) (2013 ،وفي اسيا تم التبليغ عن حالات تفشي لمرض السحايا بالمكورات السحائية في مراكز رعاية الطفولة والمدارس تعود للمجموعة المصلية A اوC (Vyse *et al*.,2011) ، وارتفعت حالات الإصابة بالمرض سببتها المجموعة المصلية W135 في تركيا من حالة واحدة عام 2003 لتصل الى 59حالة (42.7)% خلال المدة 2005-2006 (Ceyhan *et al*.,2008) .

اما في بلدان الشرق الاوسط سُجلت حالات تفشي بالمرض في بعض الدول العربية، فظهرت حالة تفشي سببته المجموعة المصلية A في دول النيل العليا جنوب السودان كان مجموع الحالات 196حالة تضمنت 13حالة وفاة (6.6%) وذلك من شهر نيسان الى حزيران 2013 (WHO EMRO, 2013) ،كذلك سُجلت بكتريا *N. meningitidis* كمسبب قيادي لمرض السحايا ولمدة طويلة في مصر ومؤخراً وصفت كمسبب رئيسي ثاني بعد بكتريا المكورات الرئوية (Afifi *et al*.,2007). تُظهر حالات التفشي التي تعقب موسم الحج الى بيت الله الحرام في المملكة العربية السعودية كيفية انتشار المرض بسبب الازدحام ، ففي عام 1987 ظهرت حالات تفشي للمرض سببتها المجموعة المصلية A وكذلك اعقبها انتشار اخر للمرض عام 2001 اذ سُجلت 253 حالة اصابة و70 حالة وفاة بسبب المجموعة المصلية W135 ونقلت منها الى الصين وأمريكا اللاتينية (AL-Tawfiq *et al*.,2010).

2-5-8 طرائق التشخيص المختبري لمرض التهاب السحايا Laboratory diagnosis of meningitis

تشترك مجموعة من الفحوصات لتوثيق التشخيص النهائي لمرض السحايا في البشر فضلاً عن الاعراض السريرية وهي :

2-5-8-1 التشخيص البكتيري بالاستنبات Bacterial diagnosis by culture

تشمل طرائق التشخيص البكتيري ترسيب المكورات السحائية من الـCSF المتصف بعكورته لإحتوائه الخلايا القيحية Pus cells بأعداد كثيرة وتواجد بكتريا النايسيريا بأعداد عالية في السائل التي يمكن مشاهدتها تحت المجهر في مراحل الاصابة الاولى بعد تصبيغها بصبغة غرام ،ومن ناحية اخرى تقل البكتريا في الـCSF او قد لا يمكن العثور عليها عن طريق الاختبارات المباشرة خاصة في المراحل المتقدمة من الاصابة عند ذلك يزرع راسب سائل الـCSF في اوساط الزرع الروتينية المناسبة لتنمية بكتريا الـ *N. meningitidis* (الجبوري ،1990) .

اما عينات الدم فتلقح في قناني الزرع الحاوية على الاوساط الزرعية السائلة كوسط نقيع القلب والدماغ (BHI broth) لتنشيط النمو البكتيري ،وتوجد عدة عوامل تحدد فيما اذا كانت مزارع الدم ستعطي نتائج موجبة منها حجم عينة الدم المزروعة ونسبة تخفيف الدم في الوسط الزرعي السائل ومدة الحضن ،وان نسبة التخفيف المثالي لعينة الدم الملقحة في الاوساط الزرعية السائلة تساعد على التقليل من تأثير الأنظمة المضادة للبكتريا الموجودة كالأجسام المضادة ونظام المتمم وخلايا الدم البيضاء (Brooks *et al*.,2010) .

بعض مزارع الدم السائلة تضاف لها مادة كيميائية Sodium polyanethole sulfonat (SPS) وهي مادة كيميائية مانعة للتخثر Anticoagulant ومضادة للبلعمة Antiphagocytic وكابحة للأنظمة المبيدة للبكتريا Anti-bacterial systems ،ومن ناحية

اخرى يؤدي التركيز العالي من مادة SPS الى تثبيط نمو بكتريا *N. meningitidis* اذ تكون حساسة لها فلابد ان لا يتجاوز محتوى الـSPS في اوساط زرع الدم السائلة عن 0.025 % . (Brook *et al*.,2010 ; Forbes *et al*.,2007)

يتميز النمو البكتيري على وسط اكار الدم Blood agar بظهور مستعمرات لمّاعة Shiny colonies ناعمة متوسطة الحجم بقطر 1-4 مليمتر مستديرة محدبة رطبة نصف شفافة رمادية الى بيضاء اللون،تكون مستعمرات السلالات ذات المحفظة مخاطية ،لا يظهر أي تحلل للوسط ،تتحول المستعمرات بسهولة الى مستحلب عند اذابتها في السائل ،ويظهر نمو مشابه على وسط اكار الدم المسخّنChoclate agar ،يمكن تحديد بكتريا المكورات السحائية من خلال قدرتها على تخمير سكر الكلوكوز والمالتوز وبكونها موجبة لكل من فحصي الـCatalase والـOxidase (Forbes *et al*.,2007 ; Vasanthakumari , 2007) .

2-8-5-2 التشخيص بالطرائق المناعية Diagnosis by Immunological Methods

يُتبع في التشخيص السريع لمرض السحايا طريقة يتم فيها تشخيص المستضدات في الـCSF وهي اختبار التلازن Latex test (LA) (Tunkle and Scheld ,1997) ،اذ يعد هذا الاختبار من اكثر الطرق المناعية المستخدمة في تشخيص المستضد البكتيري باعتباره فحص نوعي وذا فائدة تشخيصية سريعة خصوصاً عند اعطاء المريض مضادات حياتية قبل جمع العينة وكذلك ذا حساسية Sensitivity عالية بنسبة (90-100)% وانتقائية Specificity قد تصل الى 98% ، وذُكر ان الفحص يكون موجب بنسبة 71% في الحالات المتسببة عن البكتريا *N. meningitidis* A,C,Y,W135 و65% في حالات الاصابة المتسببة عن

البكتريا *N. meningitidis* B/*E. coli* K1 و88% عن الحالات المتسببة عن *Strep. pneumoniae* و97% عن الحالات المتسببة عن *H. influenzae* (Kaldor *et al*.,1977)

3-8-5-2 التشخيص الجزيئي Molecular diagnosis

ظهرت عدد من التطورات المهمة في تقنيات علم الاحياء الجزيئي ،لكن التطور الذي حاز على الاهتمام البالغ في السنوات الاخيرة هو تقنية تفاعل البوليمر المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR) وهو احد التقنيات المستعملة لتحليل الـDNA (Rapley ,2002).

في علم الاحياء المجهرية ،ادى تضخيم الـDNA باستعمال الـPCR الى حصول تقدم هائل في جعل التشخيص سريع ودقيق عند الاصابة بالكائنات التي لا يمكن زراعتها خارج الجسم او التي تتطلب وسط زرعي معقد لنموها او اوقات حضن مطولة (Eisenstein *et al*., 1990) ،وكذلك تسمح هذه التقنية لأي جزء مرغوب من الـDNA بالتزايد العددي Amplification الى ما يقارب من مليون ضعف على شرط ان يكون جزء من التتابع النيوكليوتيدي معروف بالفعل ،وتتضمن استعمال زوج من القطع القصيرة من الـDNA المفرد الخيط تدعى البادئات Primers مع انزيم بلمرة الـDNA الثابت حرارياً DNA polymerase (Taq polymerase) لانجاز عملية التضاعف الانزيمي لجزء الـDNA المستهدف ،بالإضافة الى محلول مناسب Buffer للتحكم في درجة الحموضة والقلوية لوسط التفاعل ،ووجود القواعد النايتروجينية dNTPs وكذلك توفر درجة الحرارة المناسبة (حسن ،2004).

ان تقنية الـPCR تتطلب سلسلة متكررة من الخطوات الاساسية الثلاثة وتعرف معاً بدورة الـPCR : عملية دنترة Denaturation الـDNA المزدوج السلسلة وتحويله الى سلاسل مفردة ثم عملية تلدين Annealing وارتباط البادئات مع سلاسل الـDNA القالب المفردة ومن ثم عملية

الاستطالة Extension الانزيمية للبادئات لإنتاج النسخ التي تعمل كقوالب في الدورات اللاحقة، وقد استخدم الـPCR بشكل واسع في مجال التكنولوجيا الحيوية وفي دراسات الامراض الوراثية لتمييز الجينات الجديدة وفي مختبرات الطب الجنائي (الجرائم) والطب الشرعي(تحديد الأبوة) وكذلك في كشف الممرضات الملوثة للأغذية والمسببة لبعض امراض التسمم الغذائي وتلك الممرضات الملوثة للبيئة ،فضلا عن استخدامه في تعيين البصمة الوراثية ومشروع الخارطة الجينية البشرية (Kolmodin and Birch ,2002) .

حديثاً ،اصبحت الفحوصات المعتمدة على الـPCR الطريقة الممكنة والأفضل للتشخيص الدقيق والمبكر لمرض التهاب السحايا البكتيري والتي تستهدف ممرضات معينة كبكتريا المكورات السحائية وبكتريا المكورات الرئوية وبكتريا المستديمات النزلية ،ووجدت الدراسات الحديثة ان تقنية الـPCR مفيدة لكشف الحامض النووي البكتيري من عينات الـCSF للحالات التي يشك بإصابتها بمرض التهاب السحايا اذ تبلغ حساسيتها 100% مقارنة بطريقة الزرع التقليدية اضافة الى امكانية انجازها بفترة زمنية قصيرة مقارنة بالزرع ،وقد تم استخدامها في الآونة الاخيرة في العديد من بلدان اوربا واستراليا ونيوزيلندا لتشخيص مرض التهاب السحايا لكنها لم تستخدم في التشخيص الروتيني او لمراقبة الحالات في العالم ،ونظراً لحساسية التقنية فان الاعداد القليلة من البكتريا يتم كشفها دون ان يؤثر عليها اعطاء المضادات الحيوية مسبقاً للمريض ،ويوفر الفحص الجزيئي لعينات الدم الطريقة الافضل لإعطاء الدقة والحساسية المطلوبة للتشخيص السريري لالتهاب السحايا في الحالات التي يمنع فيها استخدام عملية وخز المنطقة القطنية(LP) فتقل امكانية توفر عينات الـCSF لطرائق التشخيص التقليدية من زرع و تصبيغ غرام او اختبارات المستضد (Ghotaslou *et al*.,2012) .

تمثل عملية اختيار الجينات الهدف وتصميم البادئات قليلة النيوكليوتيدات عنصر مهم وحاسم في تحديد حساسية الـ PCR المعتمدة على تتابع البادئات وعلى الجين الذي يتم اختياره (He *et al*.,1994) . ويعد جين *ctrA* الجين الفريد Unique الخاص ببكتريا *N. meningitidis* المشفر لبروتينات الغشاء الخارجي المشتركة في نقل مادة عديد السكريد الداخلة في تركيب محفظة البكتريا ،وأجزاء الجين شائعة بشكل كبير لكل المجاميع المصلية لبكتريا المكورات السحائية(Frosch *et al*.,1992) ، وقد استخدم الجين كبادئ بطول 111 قاعدة نايتروجينية لكشف DNA بكتريا النايسيريا في عينات الـCSF واستعمل ايضاً لكشف البكتريا في عينات الدم،و لكلا العينتين تبلغ حساسية البادئ ودقته اكثر من 90% للحالات المؤكدة مختبرياً وغير المتأثرة بالعلاج الحيوي المسبق ; Guiver *et al*., 2000) .Newcomb *et al*.,1996)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل
Materials and Methods

المواد وطرائق العمل Materials & methods

1-3 المواد والأجهزة المستخدمة Materials and Device

1-1-3 الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة

جدول (3-1) الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة

ت	اسم الجهاز أو المستلزم		الشركة المصنعة والمنشأ
1	المؤصدة	Autoclave	Hirayama(Japan)
2	الحاضنة	Incubator	Gallenkamp(England)
3	الفرن الكهربائي	Oven	
4	جهاز التقطير	Water distiller	LabTech(Korea)
5	الكابينة المعقمة	Laminar flow cabinet	
6	صفيحة ساخنة مغناطيسية	Hot plat stirrer	
7	حمام مائي	Water bath	
8	جهاز النبذ المركزي	Centerfuge	Hettich(Germany)
9	جهاز النبذ المركزي المبرد	Cooling centerfuge	
10	جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoresis apparatus	Techne me(England)
11	مجهز الطاقة الكهربائية المستمر	Electrophoresis constant power supply	
12	جهاز تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل	Thermal cycler DNA incubator	
13	ميزان الكتروني حساس	Electrical sensitive balance	Sartorius(Germany)
14	مجمدة	Freezer	General(Japan)
15	نظام الجار	Gas pak system	BBL/KARL kolb(Germany)
16	جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية	UV light transillminator	Syngene(England)
17	كاميرا رقمية	Digital camera	Canone(Japan)
18	مصباح بنزن	Benzen burnner	Glassco(India)
19	مازج	Vortex	Dubuque(USA)
20	ماصات اوتوماتيكية	Automatic micropipettes	Labtech(Korea)

21	كفوف بلاستيكية	Latex medical gloves	Demotek(Malaysia)
22	فيال باثولوجي	Universal bottles pathological viales	Marienfeid(Germany)
23	حافظة مبردة لنقل العينات	Cooling box	صنع محلي
24	انابيب تحوي مادة مانعة للتخثر	EDTA coated tube	LP(Italy)
25	زجاجيات مختلفة	Pyrex	Schoot(Germany)
26	محقنة طبية	Medical syringe	Alshifa(KSA)
27	انابيب ابندروف	Eppendrofs tube	China
28	تبات	Pipets tips	China
29	ورق ترشيح غشائي	Membrane filter paper	Bright(China)
30	اطباق بلاستيكية	Petri dishes	Plastilab(Lebanon)
31	انابيب بلاستيكية	Tubes	Afco-Dispo(Jordan)

2-1-3 المواد الكيميائية والكيمياحيوية والعدد Chemical&biochemical materials and kits

جدول(3-2) المواد الكيميائية والكيمياحيوية والعدد المستخدمة في الدراسة

ت	اسم المادة		الشركة المصنعة والمنشأ
1	عدة استخلاص DNA	Reagent Genomic DNA KIT (cat.GE100/01K)	Genaid(Korea)
2	بروتنيز K	Proteinase K	
3	معلمات الحجم	DNA Ladder Marker (100-2000bp)	Bioneer(Korea)
4	ماستر مكس	PCR PreMix	
5	بوادئ	Primers	
6	اكاروز	Agarose	BioBasic(Canada)
7	محلول بفر منظم	10X TBE Buffer Solution	
8	بروميد الأثيديوم	Ethidium Bromide	
9	محلول التخفيف	TE Buffer ph8.0	
10	ايزوبروبانول	Isopropanol	Scharlau(Spain)
11	كحول أثيلي مطلق	Absolut Ethanol	
12	وسط مرق نقيع القلب والدماغ	Brain Heart Infusion Broth	Oxoid(England)
13	عدة توليد غاز CO2	Gas generation Kit/carbondioxid system	
14	وسط اكار الدم الأساس	Blood agar base	Himedia(India)
15	العدة التشخيصية للأنتجين البكتيري	Wellcogen Bacterial Antigen Kit	Remel Europeltd(England)
16	ماء مزال الأيون	Deionized water	Farabi
17	دم الأنسان	Human blood	مصرف الدم/كربلاء

2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

حضرت الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة على وفق تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121° م و ضغط 15 باوند / انج² لمدة 15 دقيقة، هذه الأوساط تشمل :

1-1-2-3 وسط اكار الدم Blood Agar

حُضر بإضافة دم الإنسان بنسبة 5% الى الوسط الأساس(Blood agar base) المُحضّر على وفق تعليمات الشركة المجهزة(Himedia) والمعقم بالمؤصدة والمبرد الى 45 مْ مزجت المكونات جيدا ثم صُبت في الأطباق الزرعية، أستعمل هذا الوسط لتمييز البكتريا المحللة للدم عن غير المحللة له (Harley and Prescott, 1996).

2-1-2-3 وسط اكار الدم المسخن Choclate Agar

حُضر مختبرياً بإضافة 5% من الدم الى الوسط الأساس(Blood agar base)المعقم ثم سُخن الوسط الى أن اصبح غامق اللون بعدها بُرد الى 45 مْ وصُب في الأطباق، أستخدم هذا الوسط لتنمية بكتريا*Neisseria meningitidis* (Atlas *et al*.,1993).

3-1-2-3 وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth

حُضر بإضافة 37 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ووزع الوسط في أنابيب زَرع الدم الزجاجية(فيالات باثولوجية) وعُقم ، ثم حُضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة لغرض التأكد من التعقيم،حُفظت عند 4 مْ لحين الاستعمال، أُستعمل هذا الوسط لتنمية البكتريا وتنشيطها وإدامتها(Baron *et al*.,2005).

2-2-3 جمع العينات Collection of specimens

جمعت العينات من مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الحسين (ع) وللمدة الزمنية من 1-12-2012 ولغاية1-5-2013 ،اذ شملت عينات الدراسة 50 عينة من السائل النخاعي الشوكيCSF لمرضى مشكوك بإصابتهم بالتهاب السحايا بناءاً على التشخيص السريري الأولي من أعراض وفحوصات طبية تجرى من قبل الطبيب المختص،كما تم جمع 50 عينة دم Blood لذات الأشخاص قيد الدراسة. وقد شملت العينات كلا الجنسين وبأعمار من40 يوم الى 15 سنة.

أُعدت استمارة خاصة لهذه الدراسة تضمنت جمع المعلومات بشكل مباشر من المشمولين بالدراسة إذ شملت المعلومات كل من العمر،الجنس،الاعراض،تاريخ أخذ العينة واستخدام المضادات الحيوية قبل جمع العينة.

1- عينة سائل النخاعي الشوكي CSF sample

تم سحب العينة من كل حالة مشكوك بها من المنطقة القطنية للعمود الفقري بطريقة وخز المنطقة القطنية(البزل القطني) Lumbar puncture (LP) على يد الأطباء المختصين وبمقدار 3-5 مل ، جمعت العينة في انبوبة اختبار معقمة أُجريت لها فحوصات الزرع الجرثومي والمناعي والجزيئي ،وتم تثبيت معلومات عن مظهر الـ CSF كان لها دور في الدراسة.

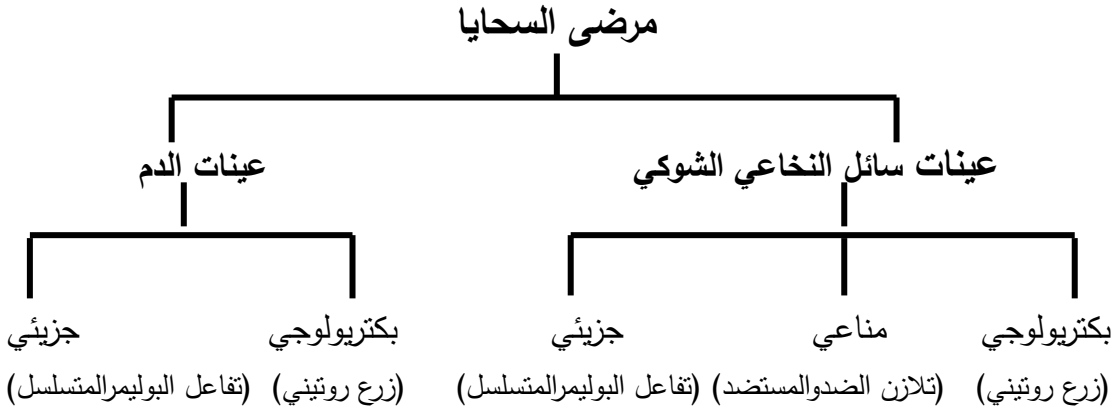
2- عينة الدم Blood sample

تم سحب 2.5-3 مل من الدم الوريدي من ذات الحالات المشكوك بها بواسطة محقنة طبية بعد تطهير المنطقة بالايودين ثم بالكحول 70% ومُنع لمس المكان بعد تطهيره وقسمت عينة الدم الى:

- 1 مل تم وضعه في أنابيب مانعة للتخثر EDTA اذ تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم وحفظت في التجميد ومن ثم نقلت في صندوق مبرد الى مختبر الدراسات العليا–قسم علوم الحياة–كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة كربلاء لأجراء الفحوصات الجزيئية لها.
- 1-2 مل تم حقنها في انابيب الزرع الباثولوجي(فيالات المستنبت السائل BHI) بعد تدفئة الانبوب بوضعه في الحاضنة او تركه لفترة لحين الوصول الى درجة حرارة الغرفة وتم تعقيم غطاء الانبوب جيداً بالأيودين قبل الحقن. كانت كمية الدم المطلوبة للمزرعة بنسبة 10:1 من كمية المستنبت السائل وتم تجهيز 10 مل من المستنبت للأطفال بعمر اقل من سنة و20مل للأعمار الأكثر من سنة. استخدمت هذه الكمية لإجراء فحوصات الزرع الجرثومي اذ تم إجراءها في مختبر البكتريا التابع لمستشفى كربلاء التعليمي للأطفال.

3-2-3 فحص العينات processing of samples

يتضمن مبدأ الدراسة ما يلي:



شكل(3−1) مخطط يوضح مبدأ الدراسة

1-3-2-3 طرائق الزرع الاولية والثانوية والتشخيص primary culture , subculture and identification

1-عينة سائل النخاعي الشوكي CSF

بعد جمع عينات الـCSF نُقلت حالاً الى مختبر البكتريا في مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال خلال ساعة واحدة من وقت الجمع، نُبذت في جهاز النبذ المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 4000 دورة/دقيقة ، تم سحب العالق لغرض استخدامه للفحوصات المناعية (اختبار الـLatex) الراسب أُعيد تعليقه مع السائل المتبقي عن طريق رَجّه بلطف او باستخدام المازج ومن هذا المعلّق استخدمت قطرة او قطرتين لتلقيح كل من الاوساط الزرعية الاولية الآتية :- (Dunbar *et al*., 1998;Bohr *et al*.,1983)

- وسط اكار الدم الصلب (%5) Blood agar حُضن بظروف CO2 %5 باستخدام Gas generation kit او تحضين في الـ Candle-jar وتحت درجة حرارة35مْ ورطوبة تم توفيرها بوضع قطع قطن مبلل ولمدة 48 ساعة.
- وسط اكار الدم المسخن Choclate agar حُضن تحت نفس الظروف.

السائل المتبقي من المعلّق(العينة) حفظ تحت درجة حرارة 70- مْ لغرض اجراء الفحوصات الجزيئية من عمليات استخلاص الـ DNA و الـ PCR والذي تم في مختبرات الدراسات العليا في جامعة كربلاء.

2- عينة الدم Blood sample

نقلت انابيب الزرع الباثولوجي الحاوية على المستنبت السائل وعينة الدم بعد جمعها مباشرة الى المختبر وحُضنت تحت درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، في اليوم التالي أُخذت قطرة من مزرعة الدم ولقّح بها:-

- وسط اكار الدم الصلب (%5) Blood agar ،حضنت تحت 5% CO2 او Candle-jar ودرجة حرارة 35 مْ لمدة 24-48 ساعة.
- وسط اكار الدم المسخن Choclate agar لُقح تحت نفس الظروف.

واستمر التحضين في الحالات السلبية لمدة سبعة ايام (Murray *et al*.,2007).

2-3-2-3 مبدأ وطريقة عمل اختبار اللاتكس Latex agglutination for antigen detection

يستخدم هذا الاختبار فقط لكشف وجود مستضد عديد السكريد المحفظي الخاص ببكتريا *N. meningitidis* في عينات سائل النخاعي الشوكي ، يتم هذا الاختبار بوساطة استخدام Wellcogen Bacterial Antigen Kit من قبل شركة Remel ويعتمد مبدأه على تلازن جزيئات Polystyrene latex المغلفة بالأجسام المضادة اذ انها تتلازن عند توفر المستضد المشابه لها بكميات كافية. يتكون هذا الاختبار من المكونات التالية :-

- **Test Latexes:** خمس قناني كل واحدة خاصة لنوع بكتيري وتشمل B *Streptococcus* ، b *H. influenzae* ، *Strep. Pneumoniae* ، A C Y W135 *N. meningitidis* ، K1 *Escherechia coli*/B *N. meningitidis* .

-**Control Latexes:** خمس قناني تحتوي على معلق من جزيئات polystyrene latex في محلول ومغلفة بكلوبيولين الارنب.

-Polyvalent positive control: قنينتين حاوية على مستخلصات بكتيرية مجففة بالتبريد حاوية على مستضدات من سلالات الانواع البكتيرية المجهز بها الـ latex.

-Negative control: قنينة واحدة حاوية على محلول ملح الكلايسين PH 8.2 و Bronidox .

أُتبعت خطوات الاختبار بحسب تعليمات الـ kit الموصى بها من قبل الشركة المجهزة وكالآتي:-

- تم هزّ كواشف الـ Latex برفق لكي تتجانس وتركت لتصل درجة حرارة الغرفة بعد ان كانت محفوظة تحت 4 مْ .
- وضعت قطرة من كلٍ من Test Latexes في دائرة منفصلة على بطاقة التفاعل.
- باستخدام قطارة Disposable وضعت قطرة واحدة تقريباً 40 مايكروليتر من عالق الـ CSF بالقرب من كل قطرة Test Latex.
- مُزجت محتويات كل دائرة بواسطة عود خشبي Stick منفصل ووزعت لتصل حواف الدائرة .
- دُورت البطاقة ببطء وتم مراقبة التلازن خلال3 دقائق ويعتمد على رؤية التلازن بالعين تحت ضوء ساطع دون استخدام العدسات المكبرة .
- لوحظت النتائج خلال الوقت المحدد من مدة المزج اذ ان التفاعل الموجب يستدل عليه من خلال ظهور تثاقل (تلازن) لدقائق الـ Latex ،اما التفاعل السالب أستدل عليه من بقاء الكواشف متجانسة التكوين وبمظهر حليبي خفيف .

مع مراعاة اجراء اختبار السيطرة بمزج قطرة من عالق الـ CSF مع قطرة من محلول السيطرة .

3-3-2-3 الفحوصات الجزيئية

تم استخلاص الحامض النووي الـ DNA من عينات الـ CSF وعينات الدم للعينات المشمولة بالدراسة لغرض أجراء الفحص الجزيئي لجين البكتريا المشمولة بالدراسة المراد الكشف عنها.

1-3-3-2-3 استخلاص الـ DNA

***مكونات عدة استخلاص الـ DNA Extraction Kit Components**

جدول(3-3) المواد المستخدمة في استخلاص الـ DNA

المكونات Components	الكمية Amount
1 - محلول تحليل الخلايا Cell lysis buffer	(100) مل
2 - محلول تحليل كريات الدم الحمر RBC lysis buffer	(360) مل
3- محلول ازالة البروتين Protein remove buffer	(40) مل
4- محلول اعادة هدرجة الـ DNA DNA Rehydration buffer	(50) مل

***طريقة استخلاص الـ DNA Protocol extraction DNA**

- تم استخلاص الـ DNA من عينات سائل النخاعي الشوكي(CSF) حسب طريقة Reagent Genomic DNA kit Tissue protocol وكما ورد في تعليمات العدة (kit) لشركة Genaid .

- تم تجهيز محلول البروتنيز Proteinase K المجهز كمسحوق بحسب تعليمات شركة Genaid بإضافة 1.1 مل من الماء المزال الأيون Deionized water الى 11ملغم من المسحوق.

1- وضعت عينة الـ CSF في انابيب ابندروف معقمة ونبذت بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.

2- استبعدت الطبقة العلوية مع الاحتفاظ بما يقارب 50 مايكروليتر من محلول الراسب، ثم رجّت الانابيب لتعليق المكونات الخلوية.

3- اضيف 300 مايكروليتر من محلول Cell lysis buffer ومزجت المحتويات عن طريق التقليب.

4- اضيف 20 مايكروليتر من محلول Proteinase K الى خليط العينة ومزجت المحتويات بواسطة المازج.

5- حضنت الانابيب في حمام مائي تحت درجة حرارة 60 مْ لمدة 30-60 دقيقة لتحليل العينة، خلال الحضن تقلب الانابيب كل 5 دقائق.

6- اضيف 100 مايكروليتر من محلول Protein removal buffer الى العينة ومزج حالاً لمدة 10 ثواني.

7- وضعت الانابيب في الثلج لمدة 5 دقائق.

8- نبذت الانابيب بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق.

9- نقل الرائق الى انابيب حاوية على 300 مايكروليتر من الايزوبروبانول Isopropanol ثم مزج الخليط بلطف لمشاهدة خيوط الـ DNA.

10- نبذت الانابيب بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.

11- أهمل الايزوبروبانول Isopropanol بلطف وأضيف 300 مايكروليتر من الايثانول Ethanol 70% إلى الـ DNA المتمركز على جدران الأنبوبة ثم رجت الأنابيب لغسل الـ DNA.

12- نبذت الانابيب بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق.

13- تم إزالة الايثانول Ethanol بلطف ثم قلبت الأنابيب على ورق نشاف لتجفيفها لمدة 15 دقيقة.

14- أضيف 100مايكروليتر DNA Rehydration buffer ثم حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 60 مْ لمدة 30-60 دقيقة مع الرج كل 5 دقائق لحين ذوبان راسب خيوط الـ DNA.

15- حفظت الأنابيب بدرجة حرارة 20- مْ في المجمدة Freezer.

-تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب طريقة Reagent Genomic DNA kit blood protocol وكما ورد في تعليمات العدة (kit) لشركة Genaid .

1- أضيف 300 مايكروليتر من الدم إلى ابندروف حاوية على 900 مايكروليتر من محلول RBC lysis buffer ومزج الخليط بلطف وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق لتحليل كريات الدم الحمراء.
2- نبذت الانابيب بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
3- أهمل الرائق بلطف من دون أتلاف الطبقة البيضاء مع ترك ما يقارب 50 مايكروليتر من الراسب ثم رُجّت الأنابيب لتعليق المكونات الخلوية.
4- اضيف 300 مايكروليتر من محلول Cell lysis buffer ومزجت المحتويات بالماصة الدقيقة ثم حضن الخليط بدرجة حرارة 60 مْ على الاقل لمدة 15 دقيقة الى ان يكون مظهر الخليط رائق والتحلل كامل.
5- اضيف 100 مايكروليتر من محلول Protein removal buffer الى العينة ورجّت الانابيب بلطف لمدة 10 ثواني ثم وضعت الانابيب في الثلج لمدة 5 دقائق.

وأُتبعت باقي خطوات الاستخلاص التي تم اجراءها على عينة سائل النخاعي الشوكي من خطوة رقم (8) وصولاً الى حفظ الانابيب بدرجة حرارة 20- مْ في المجمدة Freezer.

2-3-3-2-3 التوصيف الجزيئي لجين *ctrA*

تعد محفظة المكورات السحائية عامل فوّعة شديد الخطورة في نشوء امراضية البكتريا، و يعد الجين *ctr A* هو الجين المشفر لبروتين الغشاء الخارجي الذي يساهم في نقل مادة عديد السكريد المحفظي(Corless *et al*.,2001; Frosch *et al*.,1992) ، والذي لم يدرس على المستوى الجزيئي في العراق وفي مدينة كربلاء .

***اختيار البادئات**

تم اختيار البادئات Primers وكما موضح في الجدول رقم (3-4) لغرض أجراء الكشف الجزيئي (Taha *et al*.,2005; Guiver *et al*.,2000; Kaczmarski *et al*.,1998 (Hedberg *et al*.,2009;Fernandes-Rodriguez *et al*.,2008;

جدول (3-4) البادئات المستخدمة في الكشف الجزيئي عن الجين المدروس *ctrA* لبكتريا *N*. meningitidis

Name of gene	Sequence	Product size(bp)
ctrA Forward	5'-GCT GCG GTA GGT GGT TCA A-3'	111
ctrA Reverse	5'-TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA-3'	

كما تم اختبار البادئات بواسطة برنامج In-silico PCR (http:/in silico.ehu.es/pcr) وكما هو موصوف من قبل Teh واخرون (2009) اذ تم فحص البادئات مع انواع المسببات البكتيرية الاخرى لمرض التهاب السحايا لغرض التنبؤ بفرص وجود تطابق في التتابع المحدد للجين قيد الدراسة ولم يظهر وجود أي تطابق للبادئ مع أي نوع بكتيري آخر باستثناء بكتريا *N. meningitidis* كما هو موضح في الملحق رقم (1) .

***تخفيف البادئ**

جُهزت البادئات جميعها من شركة Bioneer Company/ Korea كمسحوق مجفد Lyophilized product ، تم تحضير المحلول الخزين Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب تعليمات شركة Bioneer. حُضر المحلول الخزين وذلك بإضافة الماء المزال الأيون Deionized water للحصول على التركيز النهائي للعالق100 بيكومول/مايكروليتر. أما محلول العمل Working solution فقد تم تحضيره بواسطة سحب 10مايكروليتر من المحلول الخزين 100 بيكومول/مايكروليتر وتخفيفه بـ 90 مايكروليتر من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو 10بيكومول/مايكروليتر.

3-3-3-2-3 تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل لجين *ctr A* الخاص ببكتريا *N. meningitidis*
Polymerase Chain Reaction (PCR) for *ctr A* gene

يوضح الجدول رقم (3-5) المواد المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل للعينات المدروسة.

جدول (3-5) المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

Component	Reaction size/20 reaction
Taq DNA polymerase	1U
Each:dNTP(d ATP ,d CTP ,d TTP)	250µM
Tris-HCl (ph 9.0)	10mM
KCl	30mM
MgCl2 stabilizer and tracking dye	1.5mM
Tamplete DNA	6-8ng
Primer	5 pmole
H_20	12 µl

بعد ذلك تم مزج المحتويات بواسطة الزّج ثم نقلت الانابيب الى جهاز الPCR ،ويوضح الجدول التالي البرنامج المستخدم في الكشف الجزيئي باستخدام تقنية الPCR بحسب نوع الجين المدروس (ابو المعالي ،اتصال شخصي)

جدول (3-6) برنامجTouch down المستخدم للكشف عن الجين *ctrA* لبكتريا *N. meningitidis*

No	Steps	Tempreture	Time	No. of cycle
1	Initial Denaturation	94 C°	5 min.	1
2	Denaturation	92 C°	30 sec.	10
3	Annealing	60 C°	30 sec.	
4	Extension	72 C°	30 sec.	
5	Denaturation	92 C°	30 sec.	40
6	Annealing	First 59 C°	30 sec.	
		Last 56 C°	30 sec.	
7	Extension	72 C°	30 sec.	
8	Final extension	72 C°	5 min.	1
9	Final hold	4 C°	-	

4-3-3-2-3 تحميل ناتج تفاعل البلمره المتسلسل والترحيل الكهربائي
Loading PCR product & Electrophoresis

*** مواد الترحيل الكهربائي Reagents of Gel Electrophorssis**

1- اكاروز Agarose

2- محلول بفر المنظم 10X TBE buffer solution

3- بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

4- معلمات الحجم DNA Ladder Marker (100-2000 bp)

*** خطوات الترحيل الكهربائي Protocol of Gel Electrophoresis**

- **تحضير جل الاكاروز**

1- تم إذابة 2غم من الأكاروز في 100مل من 1 X TBE بواسطة تسخين المزيج الى درجة الغليان باستخدام صفيحة حرارية الى ان تم اذابة كل دقائق الجل اذ يبدو المزيج رائق من دون أي دقائق عالقة في المسحوق.

2- تم اضافة 2 مايكروليتر(تركيز0.5 ملغم/مل) من بروميد الاثيديوم Ethidium bromide الى سائل الاكاروز.

3- حرّك سائل الاكاروز لكي يمتزج ولتجنب حدوث فقاعات.

4- صُب المزيج في صفيحة الاسناد Tray وبعد غمس المشط Comb قرب احدى نهايتي الصفيحة.

5- ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة .

6- تم ازالة المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة .

7- وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غُطيت ببفر الترحيل 1X TBE وعلى ارتفاع (1) ملم فوق سطح الجل .

- **تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل Loading PCR product**

تم تحميل 4 مايكروليتر من الـ DNA ladder مع 10 مايكروليتر من نواتج الـ PCR في جل الاكاروز 2% (1X TBE buffer) اذ تم الترحيل على طاقة كهربائية مقدارها 70 فولت ولمدة 45 دقيقة ،صُبغ الجل بصبغة بروميد الاثيديوم السائلة وبكمية 2 مايكروليتر، تم مشاهدة الحزم بواسطة مطياف الاشعة الفوق البنفسجية UV

transiluminater وتم تصويرها باستخدام كاميرا رقميةDijital camera (Guiver *et al*.,2001 ; Maniatis *et al*.,1982) .

5-3-3-2-3 التحليل الاحصائي Statistical analysis

لغرض تحليل النتائج احصائياً،تم استخدام اختبار Chi-square على مستوى معنوية p=0.05 لتحديد الفروقات الاحصائية والمعنوية للنتائج باستخدام برنامج SPSS v18.

كما تم حساب حساسية Sensitivity ومعنوية Specificity التقنيات المستخدمة لكل من عينات الـCSF وعينات الدم بتطبيق المعادلات الآتية (AL-Rashedi *et al*.,2009):

$$\text{Sensitivity}(\%)= \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False positive}} \times 100$$

$$\text{Specificity}(\%)= \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False negative}} \times 100$$

الفصل الرابع

النتائــج و المناقشــة

Results and Discussion

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـ PCR

اوضحت نتائج الاختبار في جدول (4-1) والملحق(2) الخاصة بتحديد نسب وجود او عدم وجود البكتريا في 50 عينة دم للمرضى قيد الدراسة والمشتبه بإصابتهم بمرض السحايا باستخدام اختباري الزرع والـ PCR ان عدد الحالات المشخصة بتقنية الـ PCR بلغت 15حالة (30.0%) من مجموع حالات الوجود لعينات الدم ،اما فيما يخص طريقة الزرع التقليدية فلم تظهر أي نسب وجود للبكتريا في عينات الدم اذ كانت النسبة 0.0% ،وقد وجدت فروقات احصائية معنوية عالية في القدرة التشخيصية للاختبارين في عينات الدم ($P<0.05$) اذ كانت الفروقات المعنوية (0.00) .

جدول (4-1)النسبة المئوية لعزلات بكتريا*N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـPCR

التقنيات	عينات الدم			
	وجود		عدم وجود	
	العدد	النسبة	العدد	النسبة
الزرع	0 A	%.0	50 A	%100.0
PCR	15 B	%30.0	35 B	%70.0

*الفروقات تقرأ بشكل عمودي وتدل الحروف غير المتشابهة على وجود فرق معنوي بين المجموعتين عند مستوى دلالة 0.05 اما الحروف المتشابهة فتدل على عدم وجود فرق معنوي بينهما .

بينت نتائج الدراسة الحالية ان عدد الحالات المشخصة للمرض بتقنية الـ PCR التي سببتها بكتريا *N. meningitidis* من مجموع 50 عينة دم بلغت 15حالة (30.0%) ،وقد أشار Seward و Towner (2000) ان عدد حالات الكشف لديه بتقنية الـ PCR للبكتريا قيد الدراسة في عينات الدم بلغت14 حالة ،في حين حصل Pollard وآخرون (2002) على 10حالات من مجموع 11حالة بتقنية الـ PCR ،وأشار الباحث الى ان ادخال اختبار الـ PCR السريع والحساس للكشف عن مرض السحايا بالمكورات السحائية في عينات الدم يمثل تقدم هائل وفي الوقت المناسب لتشخيص المرض .

وأكدت منظمة الصحة العالمية ،(2011) ان معدل عزل المكورات السحائية من مستنبت الدم يقل من نسبة 50% الى اقل من5% ،و وصف Trainor وآخرون ،(2001) طريقة الزرع بأنها مستهلكة للوقت اذ تحتاج على الاقل 24 ساعة قبل الحصول على اية نتيجة وتنخفض حساسيتها بشكل ملحوظ في الحالات التي أُخذ فيها العلاج المسبق .ان ظهور نسبة عالية من النتائج السالبة للزرع البكتيري قد يعود الى ضعف حساسية الطريقة فضلاً عن الظروف الصعبة التي تحتاجها البكتريا للنمو في البيئات الزرعية وهي صعبة الانماء Fastidious وتحتاج وقت وجهد كبيرين(La Scolea and Dryja ,1984) .

وتستطيع ان تكمل الاختبارات القائمة على تفاعل البوليمر المتسلسل السريع الاجراءات المختبرية القياسية لان هذه الاختبارات اقل تأثراً بالعلاج المسبق بالمضادات الحيوية ويجري استخدامها على نحو مطرد الزيادة ، وتم التأكيد على ذلك في دراسة للباحث Newcombe وآخرون، (1996) و Cartwright وآخرون، (1992).

أشار Davison و Ramsay (2003) الى ان العديد من مرضى التهاب السحايا لا يمكن اجراء عملية وخز المنطقة القطنية(LP) لهم بسبب ارتفاع الضغط داخل القحف او في

حالة رفض الاهل اجراء العملية لأطفالهم ،في مثل هذه الحالات تكون الاختبارات الجزيئية لعينات الدم هي الطريقة الافضل وذات حساسية ودقة اكثر للتشخيص السريري .وأكد ذلك Newcombe وآخرون، (1996) في دراسة سابقة على ان التطبيق الواسع لهذه الاختبارات المعتمدة على الـ DNA يسمح بزيادة عدد الحالات المشخصة لمرض السحايا بالمكورات السحائية الى حوالي 60% بدون الحاجة الى سحب عينة السائل النخاعي الشوكي(CSF) .

2-4 تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـ CSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن وتقنية الـ PCR

اظهرت نتائج دراستنا الحالية الخاصة بتحديد نسب وجود او عدم وجود البكتريا في 50 عينة CSF للمرضى المشتبه بهم بإصابتهم بمرض السحايا والجاري اختبارها بطريقة الزرع التقليدية واختبار التلازن وتقنية الـ PCR ان عدد حالات الكشف لتقنية الـ PCR بلغت 12حالة (24.0%) وان اختبار التلازن ادى الى كشف ثماني حالات (16.0%) من مجموع حالات الوجود لعينات الـ CSF ،في حين لم تتمكن طريقة الزرع من اظهار أي وجود للبكتريا في عينة الـ CSF اذ كانت النسبة 0.0% الملحق(3) ،وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي بوجود فرقاً معنوياً عالياً ($P<0.05$) في القدرة التشخيصية للاختبارات الثلاثة لتشخيص البكتريا في عينات الـ CSF اذ بلغت الفروق المعنوية002. (جدول4-2) .ومن خلال تقدير حساسية ومعنوية الفحوصات المختبرية لوحظ بأن فحص تفاعل البوليمر المتسلسل (PCR) هو الفحص الأكفأ في تقدير مستوى الاصابة اذ كانت حساسيته(75%) ومعنويته (75%) مقارنة ببقية الفحوصات التي وصلت حساسيتها(33.3%) ومعنويتها(94.7%) .

جدول(4-2)النسبة المئوية لعزلات بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـ CSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن والـPCR

التقنيات	عينات الـ CSF			
	وجود		عدم وجود	
	العدد	النسبة	العدد	النسبة
الزرع	0 A	%.0	50 A	%100.0
التلازن	8 B	%16.0	42 A	%84.0
PCR	12 C	%24.0	38 B	%76.0

*الفروقات تقرأ بشكل عمودي وتدل الحروف غير المتشابهة على وجود فرق معنوي بين المجموعتين عند مستوى دلالة 0.05 اما الحروف المتشابهة فتدل على عدم وجود فرق معنوي بينهما .

الواضح من نتائج الدراسة الحالية الى ان بكتريا *N. meningitidis* لم يتم عزلها من مجموع 50 عينة CSF بطريقة الزرع اذ كانت النسبة 0.0% وقد جاءت هذه النتيجة مقاربة الى نتائج دراسة اجريت من قبل Bonab وآخرون (2012) اذ اظهرت نتائج دراسته الى كشف حالة واحدة (0.9%) للمرض بسبب بكتريا المكورات السحائية بطريقة الزرع من مجموع 106 عينة CSF ،وفي دراسة AL-Naddawi وآخرون (2013) في العراق سجلت عدد حالات الكشف بالزرع عن البكتريا قيد الدراسة حالة واحدة (9.1%) لعينة الـ CSF ، وعزي سبب النتائج السالبة للزرع الى عدة عوامل اذ لابد ان يكون العدد البكتيري كافياً لتظهر نتيجة الزرع الموجب ولابد من سحب عينة الـ CSF قبل اعطاء العلاج لتعطي فرصة اكبر لنمو البكتريا مختبرياً.

وجد Ghotaslou وآخرون ،(2012) ان نسب تشخيص مرض التهاب السحايا بوساطة تقنية الـ PCR واختبار التلازن والزرع بلغت 6.85% ، 5.05% و3.97% على التوالي ،ويعود

ذلك الى العلاج المسبق بالمضادات الحيوية فضلاً عن الحساسية الشديدة للمسببات البكتيرية لمرض السحايا او كونها بطيئة او صعبة النمو خارج الجسم الحي .

وأشار Papavasileiou وآخرون ،(2011) الى ان من بين 56 حالة لالتهاب السحايا، كانت طريقة الزرع موجبة في 21% فقط من الحالات بينما 77% من الحالات كُشفت بوساطة تقنية الـ PCR . وأكد Kristinsen وآخرون ،(1991) و Ni وآخرون، (1992) ودراسة Solbrig وآخرون ،(2000) و Pandit وآخرون، (2005) عندما قارنوا طريقة الزرع التقليدية بتقنية الـ PCR لعزل مسببات مرض التهاب السحايا ومنها بكتريا المكورات السحائية واستنتجوا ان الـ PCR اكثر سرعة وحساسية وخصوصية لكشف DNA البكتريا في الاعداد الكثيرة من الحالات السالبة الزرع لعينة الـ CSF بعد العلاج المسبق بالمضادات الحيوية والتي تجعل من عينة الـ CSF المسحوبة خالية من الوجود البكتيري بعد 12 ساعة او اكثر من مدة اخذ العلاج في حين ان الفحوصات الجزيئية لا تتأثر بالعلاج المسبق .

وبخصوص اختبار التلازن (LA) فقد جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة مع ما ذكره Finlay وآخرون (1995) من ان الاختبار تمكن من كشف سبع حالات(38%) موجبة لبكتريا *N. meningitidis* من مجموع 18 حالة اذ لا يتأثر الاختبار بالعلاج المسبق بالمضادات الحيوية .ان معظم البكتريا المسببة لمرض السحايا ذات محفظة وخلال مرحلة الاصابة تطرح كميات كبيرة من هذه المواد المتعددة السكريات Polysaccharide الى السوائل الجسمية وتكون هذه المواد معرضة لعملية البلعمة لكنها مقاومة للانحلال Degradation والتحرر للدورة الدموية بوساطة الحويصلات Exocytosis ولذلك بالإمكان تشخيصها بشكل دقيق باستخدام الطرق المصلية ويعد اختبار التلازن(LA) في التحري عن الاجسام المضادة لعينة الـ CSF من

الفحوص المهمة والسريعة في تشخيص مرض السحايا وتتناسب مع وضع المريض الصحي الذي يكون بأمس الحاجة الى التشخيص السريع لإنقاذ حياته (Requejo *et al*.,1992) .

اشار Berhman وآخرون (2000) الى انه يتم الكشف عن المستضد (في حالة وجود التهاب سحايا بكتيري) في عينة الـ CSF هو امر شائع ،والبحث عن المستضد في عينات المصل غير ذي جدوى لكثرة الحالات الايجابية الكاذبة فيه ،ويفضل الاحتفاظ بالاختبارات الخاصة بالمستضد للمرضى الذين يتلقون المضادات الحياتية بعد ان تم اخذ العينات منهم بغية الزرع وذلك بالنظر لبقاء المستضدات قابلة للكشف لعدة ايام بعد المباشرة بإعطاء المضادات الحياتية فيما قد تعطي الطريقة الزرعية في هذه الحالة نتيجة سلبية وقد يؤدي التمنيع الحديث بلقاح عديد السكريد المحفظي الخاص ببكتريا المكورات السحائية الى نتيجة ايجابية كاذبة لاختبار المستضد في المصل والبول دون ان ينطبق ذلك على الـ CSF .

3-4 تأثير الجنس في نسب وجود او عدم وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم وعينات الـCSF بالطريقة التقليدية واختبار التلازن وبتقنية الـPCR

عند دراسة تأثير الجنس على نسبة الاصابة بالبكتريا هناك تغايرات واضحة للذكور عن الإناث في كل من مجموعتي عينات الدم وعينات الـ CSF ،اذ ابدت النتائج ان مجموع حالات الوجود في عينة الدم للذكور بطريقة الـ PCR تسع حالات(16.1%) وللإناث ستة حالات (13.6%) الملاحق(6) و(7) ، وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي المقدرة الكبيرة للاختبار في تشخيص البكتريا في عينات الدم للذكور ($P<0.05$) عند المقارنة مع القدرة التشخيصية للاختبار في عينات الدم للإناث اذ بلغت (.001) و(.008) على التوالي (جدول4-3) .

في حين ابدت النتائج ان مجموع حالات الوجود في عينات الـ CSF باختبار التلازن والـ PCR للذكور 11 حالة (13.1%) وللإناث تسع حالات (13.6%) الملاحق(4) و(5)، وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي في القدرة التشخيصية للاختبارات الثلاثة في عينات الـ CSF للذكور ($P<0.05$) في حين لم يظهر فرق معنوي ($P>0.05$) في القدرة التشخيصية للاختبارات في عينات الـ CSF للإناث وبلغت(0.02) و(0.06) على التوالي (جدول4-4) .

جدول (4-3) تأثير الجنس في نسب وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بطريقتي الزرع والـ PCR

الجنس	التقنيات	عينات الدم			
		وجود		عدم وجود	
		العدد	النسبة	العدد	النسبة
ذكر	الزرع	0	%.0	28	%100.0
	PCR	9	%32.1	19	%67.9
	الكلي	9 A	%16.1	47 A	%83.9
انثى	الزرع	0	%.0	22	%100.0
	PCR	6	%27.3	16	%72.7
	الكلي	6 B	%13.6	38 B	%86.4

*الفروقات تقرأ بشكل عمودي وتدل الحروف غير المتشابهة على وجود فرق معنوي بين المجموعتين عند مستوى دلالة 0.05 اما الحروف المتشابهة فتدل على عدم وجود فرق معنوي بينهما .

جدول (4-4)تأثير الجنس في نسب وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF بطرائق الزرع و التلازن والـPCR

الجنس	التقنيات	عينات الـ CSF			
		وجود		عدم وجود	
		العدد	النسبة	العدد	النسبة
ذكر	الزرع	0	%.0	28	%100.0
	التلازن	4	%14.3	24	%85.7
	PCR	7	%25.0	21	%75.0
	الكلي	11 A	%13.1	73 A	%86.9
انثى	الزرع	0	%.0	22	%100.0
	التلازن	4	%18.2	18	%81.8
	PCR	5	%22.7	17	%77.3
	الكلي	9 A	%13.6	57 B	%86.4

* الفروقات تقرأ بشكل عمودي وتدل الحروف غير المتشابهة على وجود فرق معنوي بين المجموعتين عند مستوى دلالة 0.05 اما الحروف المتشابهة فتدل على عدم وجود فرق معنوي بينهما .

تشير نتائج هذه الدراسة جدول(4-3) و(4-4) الى ان نسبة تشخيص البكتريا في الذكور جاءت اعلى من الإناث وقد اتفقت مع ما توصل اليه الباحث AL-Rawazq (2010) من ان الذكور اعلى اصابة من الإناث اذ بلغت عدد الحالات للذكور 41 حالة (68.33%) وللإناث 19 حالة (31.67%) ، وكذلك الباحث AL-Janabi وآخرون (2008) تمكن من عزل البكتريا بنسب اعلى في الذكور من الإناث بلغت 1:1.24 ، اما الباحث Hassan (2011) فقد استنتج انه يمكن ان يكون للجنس تأثير في نسب وجود البكتريا اذ بلغت نسبة الذكور الى الإناث 1:1.5 ،قد يعزى السبب في نسب الاختلاف بين الجنسين الى عوامل تؤثر على درجة المقاومة او الى

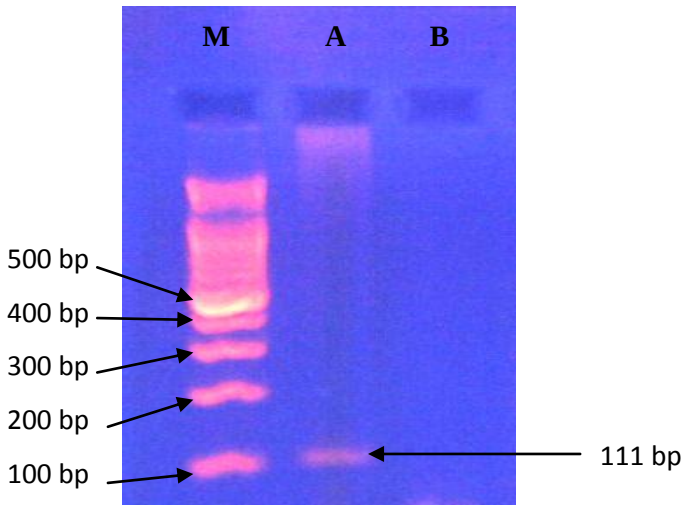
اختلاف مقدرة العوامل الموجودة داخل المضيف على الاتصال بالعوامل المسببة للمرض ،وقد ينسب السبب في ارتفاع نسبة الاصابة لدى الذكور الى الجانب المناعي فربما يكون نقص البروبردين (المنشط للمسلك الثالث للمتمم) هو خلل مرتبط بالذراع القصير للكروموسوم X وعند التحري عن نقصه يجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار عندما يكون للعائلة تأريخ لمرض السحايا بالمكورات السحائية حاصل بموجب النوع المرتبط بالكروموسوم X كون النقص حالة متوارثة Inherited (Linton and Morgan ,1999) .

لكن نتائج هذه الدراسة تناقضت مع نتائج دراسة شريف وآخرون (2008) التي بلغت فيها حالات الاصابة في الذكور ست حالات (46.15%) بينما كانت سبعة حالات (53.84%) لدى الاناث ،وأوضح ان سبب الاختلاف قد يعود الى اختلافات بايولوجية وهرمونية بين الإناث والذكور.

4-4 الدراسة الجزيئية Molecular Study

تمت دراسة امكانية الكشف عن الاصابة ببكتريا *N. meningitidis* باستخدام تقنية الـ PCR من خلال الكشف عن وجود الجين *ctr A* الخاص بالبكتريا قيد الدراسة في عينات الـ CSF وعينات الدم وأظهرت نتائج الدراسة الحالية شكل (4-1) نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR للجين *ctr A* .

اذ يمثل العمود M المعلم الحجمي Size marker بحجم 100-2000 زوج قاعدة ،بينما يُظهر العمود A الحزمة بحجم 111 زوج قاعدة والتي تمثل الجين *ctr A* ، في حين لم يُظهر العمود B أي حزم لنواتج الـ PCR لعينات الـ CSF او عينات الدم دلالة على عدم تواجد الجين *ctr A* قيد الدراسة .



شكل(4-1) الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR للجين *ctr A* على 2% جل الأكاروز عند 70 فولت ولمدة 45 دقيقة

تمثل البادئات primers المستخدمة لغرض اجراء الكشف الجزيئي على الجين *ctr A* المشفر لبروتين الغشاء الخارجي المحافظ المشترك في نقل مادة عديد السكريد المحفظي لبكتريا *N. meningitidis* في الدراسة الحالية هي ذاتها المستعملة في فحوصات الـ PCR المضاعفة multiplex لكشف مرض التهاب السحايا اذ يمثل الجين المدروس المستخدم في تقنية الـPCR الجين الفريد والخاص لبكتريا المكورات السحائية وهو عام لكل المجاميع المصلية التابعة للبكتريا (Corless *et al.*,2001) . وهنالك نظام نقل متخصص ملائم لخصائص ناقلات الطاقة (ATP-Binding Cassette) يساهم في عملية النقل الموضعي لمادة عديد السكريد المحفظي الى سطح الخلية وأحد هذه البروتينات الناقلة يدعى *ctrA* الواقع في الغشاء الخارجي لبكتريا *N. meningitidis* (Frosch *et al.*,1992) . وجرى تقييم البادئات من خلال مفاضلات رئيسية

تمت داخل المختبرات المعتمدة على تشخيص بكتريا المكورات السحائية بتقنية الـ PCR (Taha *et al*. ,2005) وكذلك في دراسات اخرى أفضت الى نتائج مُرضية (Fernandez *et al*.,2008 ; Gray *et al*.,2006) . لقد طوّر عدد من فحوصات الـPCR التقليدية لكشف وتحديد الانماط المصلية لكل من الممرضات البكتيرية و الفايروسية إذ يكشف الفحص التقليدي نواتج المرحلة النهائية من تضخيم الـDNA بواسطة تصوير النواتج (القطع المضخّمة Amplicons) باستعمال الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (CDC, 2012)

5-4 الجدوى العملية للطرائق المختلفة في تشخيص مرض السحايا في الانسان

استخدمت طرائق متعددة في تشخيص مرض التهاب السحايا المتسبب عن البكتريا *N. meningitidis* منها الطريقة الروتينية في زرع راسب عينة الـ CSF او زرع عينة الدم في الاوساط التقليدية ،وطريقة فحص عالق الـ CSF باختبار التلازن (LA) وطريقة الـ PCR لخلاصة عينة الـ CSF او لعينة الدم ،فقد وجد ان الطريقة التقليدية لزرع عينة الـ CSF ولزرع عينة الدم اعطت نسبة 0.0% ،وأعطى اختبار التلازن لعينة الـ CSF نسبة 16.0% اما الـ PCR فقد اعطى نسبة 24.0% لعينات الـ CSF و30.0% لعينات الدم .وبهذا تشكل مجموع طرائق الكشف نسبة 15.0% لعينات الدم و13.3% لعينات الـ CSF(جدول4-1) و(جدول4-2).

ومن هذا يتبين ان الطريقة التقليدية للزرع لم تعطي نتيجة فحص موجب لجميع عينات الـ CSF وعينات الدم اذ لابد من استخدام طرائق اخرى منها طريقة الـ PCR للتأكد من العامل المسبب ،فقد تكون البكتريا بأعداد قليلة جداً لا تسمح بظهور نتيجة الزرع الموجب او نتيجة تناول المضادات الحياتية قبل جمع العينة او قد تكون البكتريا متخفية داخل الخلايا البيض وربما يكون المسبب غير بكتيري ،لذا فان الطرائق المعتمدة على الاحماض النووية اسرع واكثر

خصوصية ويمكن ان تحل محل طرائق الزرع التقليدية كطريقة قياسية للتشخيص البكتيري لمرض التهاب السحايا في الانسان ،وهذا ما اكدته كذلك الدراسة التي اجراها Ghotaslou وآخرون (2012) في ايران .

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and recommendations

5-1 الاستنتاجات

من نتائج هذه الدراسة تم استنتاج ما يأتي :

1- تعد بكتريا *N. meningitidis* احد مسببات التهاب السحايا والتي لا يمكن الكشف عنها بالطرق الزرعية التقليدية ،وكانت نسبة الاصابة الأعلى لدى الاطفال بعمر من 1-9 شهر و1-5 سنة من قليلي المناعة.

2- يعد اختبار التلازن Latex agglutination في التحري عن المستضد البكتيري في عينة السائل النخاعي الشوكي من الفحوص المهمة والسريعة في تشخيص مرض السحايا.

3- من اهم طرق التشخيص البكتيري وقبل التشخيص الزرعي والمناعي هو التشخيص الجزيئي بسبب امكانية الفحص الجزيئي على كشف وجود الجين البكتيري حتى في حالة كون البكتريا فاقدة لحياتها بعد المعالجة بالمضادات الحيوية او كونها بأعداد قليلة جداً ولكونه من الفحوصات التي توفر الدقة والسرعة والحساسية المطلوبة .

2-5 التوصيات

1- ضرورة العمل بطرائق التشخيص المناعية كفحص التلازن الحاوي على الضد للكشف عن المستضد المتحرر من البكتريا في السائل النخاعي الشوكي ،وطرائق الفحوص الجزيئية للتشخيص السريع لتأكيد الاصابة.

2- اجراء دراسة للكشف عن بكتريا *H. influenzae* في عينات الدم والـCSF بطرائق التشخيص الزرعية والمناعية والـPCR للمرضى المشكوك بإصابتهم بالتهاب السحايا .

3- الاعتماد على استخدام عينات الدم بدلاً عن عينات السائل النخاعي الشوكي في تشخيص بكتريا الـ *N. meningitidis* لِما أظهرته نتائج الدراسة الحالية.

4- دراسة السايتوكينات المتحررة في اثناء الاصابة بمرض التهاب السحايا ودورها في تشخيص الاصابة .

المصـــــادر

References

المصادرReferences

أولا: المصادر العربية

ابو المعالي ،حسن محمود .(2013) .برنامج Touch down ،اتصال شخصي .

الجبوري ، محيميد مدّالله .(1990) .علم البكتريا الطبية . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر/جامعة الموصل : 387 صفحة .

حسن ،عبد المنعم صادق .(2004) .تكنلوجيا الجينات ،التدريبات العملية .قسم الكيمياء الحيوية ،كلية الزراعة بالفيوم ،جامعة القاهرة /مكتبة اوزوريس :363 صفحة .

الدو ، اياد درغام .(2004) . اهمية معايرة البروتين الارتكاسي C للمصل والسائل الدماغي الشوكي في تدبير التهاب السحايا عند الاطفال .رسالة ماجستير .كلية الطب البشري –قسم الاطفال ،جامعة تشرين /عمان :45 صفحة .

شريف ،أديبة يونس ؛ فتحي ، نجلاء عبد الله وعلي ، صادق احمد.(2008) .عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب السحايا من الاطفال . جامعة الموصل /كلية العلوم /قسم علوم الحياة .مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 13(3) .

العاني ، لمياء يعقوب ونصيف ، زينب محمد .(2006). دراسة تشخيصية مناعية لالتهاب السحايا البكتيري عند الاطفال .مجلة كلية التربية /بغداد. العدد الاول :114-124.

العزاوي ،رحاب رشيد .(2009).علم سموم البكتريا. دار المناهج للنشر والتوزيع /عمان: 271 صفحة .

منظمة الصحة العالمية WHO.(2011).السجل الوبائي الاسبوعي .اللقاحات المضادة للمكورات السحائية :ورقة موقف منظمة الصحة العالمية في تشرين الثاني/2011 ،جنيف، طبع في سويسرا،المجلد 86 :21 صفحة .

ثانيا: المصادر الاجنبية

(ACIP)Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. (2000). Prevention and Control of Meningococcal Disease. *MMWR*;49:1–10.

Afifi, S.;Wasfy, M.O.; Azab, M.A.; Youssef, F.G.; Pimentel, G.; Graham, T.W.; Mansour, H.; Elsayed, N.; Earhart, K.; Hajjeh, R. and Mahoney, F. (2007). Laboratory based surveillance of patients with bacterial meningitis in Egypt (1998-2004). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26(5):331-40.

Ala'Aldeen, D.A. and Turner, D.P.J. (2006). *Neisseria meningitidis*. In Principles and Practice of Clinical Bacteriology; 2nd edition. Stephen, H.; Gillespie PMH (ed.), pp.205-220.

AL-Janabi, M.K. ;AL-Mawali, J.M.S. and Ali, S.A.M.(2008). Iraqi Children with Acute Bacterial Meningitis... Who May Need Ventilatory Support?. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal* ;7(2):100-105.

AL-Kaisi, K.J.; AL-Chaderchi, A.A.; AL-Ethawy, S.J.; AL-Diwan, J.K. and AL-Hadithi, T.S.(2009).Meningitis in Baghdad 1993-1998 part 1:Acute Bacterial Meningitis .*J. Fac.Med.Baghdad*;51(2):159-161.

Al-Kaisi, K.J.A. (1991). Epidemiological and clinical study of septic meningitis in Ibn El-Khateeb hospital during 1993 – 1998. MSc thesis. College of medicine. Baghdad University.

AL-Naddawi, M.N.; Abdul Rasool, H.R. and Mahdi, N.(2013). Subdural effusion in bacterial meningitis experience in children Welfare teaching hospital .*The Iraqi Postgraduate Medical Journal* ;12(1):1-10.

Alonso, A. and Martinez, J.L.(2001). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia .Ant. Age. Chem.*;41,p:1140-1142.

AL-Rashedi ,N.A.M ;AL-Hamadani ,A.A. and AL-Taee , O.M.S.(2009). Confirmation of positive acid fast bacilli samples by tuberculosis bacilli culture .Q M J ;5(7) :211-217.

AL-Rawazq, H. S.(2010). Acute Bacterial Meningitis Among Children under Five Years of Age in Baghdad. *J Fac Med Baghdad*;52(3):314-317.

Al-Sharbeti, S.; Al-Abbasi, A.; Alwan, S. j. and Mukhlis, G. (1991).The use of latex agglutination test in diagnosis of bacterial meningitis. *J Comm Med Iraq*; 4: 99-104.

Al-Tawfiq, J. A. *et al*. (2010).Meningococcal disease: the organism, clinical presentation, and worldwide epidemiology. *Journal of travel medicine*, , 17 (Suppl.): 3–8.

Ananthanarayan, R. and Paniker, C.K.(2009). Textbook of Microbiology, Universities press(India)private limited;8th edition:224-231.

Anderson, M.S.; Glode, M.P. and Smith, A.L. (2004). Meningococcal disease. In: Feigin RD, Demler GJ, Cherry JD, Kaplan SL, editors. Textbook of pediatric infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Saunders; p. 1265–79.

Anderson, P.; Ingram ,D. ;Phichero, M.and Peter,G .(2000). A high degree of Natural immunologic primary to the capsular polysaccharide may not prevent *Hib* meningitis .*J. Pediatr . Infect. Dis*.19(7):589-91.

Anjum, M.F. ;Stevanin, T.M. ;Read, R.C. and Moir, J.W.B.(2002). Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitides* ,American society for Microbiology. *J. Bacteriol*. ;184(11):2987-2993.

Appleton, R.; Chooneral; Martland ,T.;et al. (2000). The treatment of convulsive status epilepticus in children .The Status Epilepticus Working Group. *Arch Dis Child*;83:415-19.

Ataee, R.A.; Tavana, M. A.; Ghorbani, G. H.; Mosavi, S. A.and Karimi A., Hajia M.,(2005).Recurrent Meningococcal Meningitis in an Iranian Conscript :a Brief Report. *Clin Microbiol Newsletter*,17:136-37.

Atlas, R. M. ;Parks, L.C., editor,(1993). Handbook of microbiological media, Boca Raton, Fla, CRC press .

Balganesh, M.; Lalitha, M. K. and Nathaniel, R. (2000). Rapid diagnosis of acute pypgenic meningitis by a combined PCR dot –blot assay .*Mol Cell Probes* ;14(2):61-9.

Baron, E.J.; Weinstein, M.P.; Dunne W.M. and *etal*., (2005).Blood cultures IV. Baron E.J., coordinating editor: Cumitech, I.C.; Washington, D.C., American Society for Microbiology.

Berhman, R. ;Kleigman, R. and Jenson, H. (2000) . *NELSON TEXTBOOK OF PEDIATRICS,* 16th edition, W.B.SAUNDERS COMPANY, U.S.A, PP 751-760.

Berkley, J.A.; Versteeg, A.C.; Mwangi, I.; Lowe, B.S. and Newton, C.R. (2004) .Indicators of acute bacterial meningitis in children at a rural Kenyan district hospital. Pediatrics;114:e713–9. DOI: 10.1542/ peds.2004-0007

Bilukha, O.O.and Rosestein, N. (2005).Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep*; 54: 1–21.

Bohr, V.; Rasmussen, N.; Hansen, B. and *et al*.,(1983).875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. Part III of a three-part series. *J Infect*;7:193-202.

Boisier, P. ;P. Nicolas; S. Djibo; M. K. Taha; I. Jeanne,;H. B. Maïnassara; B. Tenebray; K. K. Kairo; D. Giorgini and S. Chanteau. (2007). Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin. Infect. Dis*. 44**:**657–663.

Bonab, Z.H. ;Farajnia, S. ;Ghotaslou, R. and Nikkhah, E.(2012). Evaluation of nested PCR method for diagnosis of meningitis due to *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenza* .*Turk. J. Biol*.,36:727-731.

Brainin, M.; Barnes, M.; Baron, J.C. and et al.(2004). Guidance for the preparation of neurological management guidelines by EFNS scientific task forces – revised recommendations. *European Journal of Neurology*; 11: 577–581.

Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. *Lange Medical books* .McGraw-Hill Companies.USA.

Brooks ,G.F. ;Carroll ,K.C. ; Butel, J.S. ;Morse, S.A. and Mietzner , T.A.(2010). Jawetz , Melnik and Adelberg's Medical Microbiology ;diagnostic medical microbiology and clinical correlation.25th ed. *LANG Basic Science* .Mc-Graw-Hill professional .USA.832pp.

Carrol, E. D.; A. P. Thomson; F. A. Riordan; J. M. Fellick; P. Shears, J. A. Sills and C. A. Hart.(2000). Increasing microbiological confirmation and changing epidemiology of meningococcal disease in Merseyside, England. *Clin. Microbiol. Infect*. 6**:**259–262.

Cartwright, K. (2006). Historical Aspects. In Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management, pp. 1-13. Edited by M. Frosch & M. C. J. Maiden. Weinheim, Germany: Wiley-VCH verlag GmbH & Co.

Cartwright, K.; Reilly, S.; White, D. and Stuart, J.(1992). Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease .*BMJ* ;305:143-147.

Casadevall, A. and Pirofski ,L.(2009). Virulence factors and their mechanisms of action :the view from a damage-response framework .J. of Water and Health;07.s1:17.dio:10.2166/wh.2009.036.

Caugant, D.A. (1998). Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*;106:505–25.

Centers for Disease Control and Prevention(2000). Meningococcal disease and college students: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*.;49(RR-7):13–20.

Centers for Disease Control and Prevention.(2002). Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children: United States, 1998–2000. MMWR *Morb Mortal Wkly Rep*.;51:234–9.

Centers for Disease Control and Prevention.(2007). Revised recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices to Vaccinate all Persons Aged 11–18 Years with Meningococcal Conjugate Vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*.;56:794–795.

Centers for Disease Control and Prevention.(2012). Chapter 10:PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis* ,*Haemophilus influenza*e and *Streptococcus pneumoniae* .Lab Manual-Results Management and Reporting of Data:56.

Centers for Disease Control and Prevention.(2013)..Prevention and Control of Meningococcal Disease ,Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).*MMWR* ;62(2):1-28.

Ceyhan, M. ;Yildirim, I.; Paul, B.; Borrow, R.; Dikici, B. *et al*. (2008).A Prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis ,Turkey. *Emerging Infection Diseases* ;14(7):1089-1095

Chakrabarti, P.; Das, B.K. and Kapil, A. (2009). Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. *Indian J. Med. Res*., 129:182-188.

Charles, G. Prober. (2004a).Acute bacterial meningitis beyond the neonatal period; In Nelson Textbook of pediatric; Behrman, Kleigman, Johnson (eds). W.B. Saunders Philadelphia, 7th edition: 2038 -2044.

Charles, G. Prober .(2004b). Central Nervous System Infections.In Nelson textbook of pediatrics,17th ed. ,Philadlephia, WB saunders,594;2038-2046.

Chen, L.; Xiong, Z.; Sun, L. ;Yang, J. and Jin, Q.(2011).VFDB2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors .*Nucleic Acids Research* .40 Database issue :D641-D645.doi:10.1093/nar/gkr989.

Cheng-Hsien , Chi-Ren Huang and Nai-Wen Tasi,(2002). An adult case of *Chryseobacterium meningosepticum* meningitis ,Jpn.,*J.Infect.Dis*.,57; p:214-215.

Chiou, c.S.; Liao, J.C.; Liao, T.L.; Li, C.C.; Chou, C.Y.; Chang, H.L.; Yao, S.M. & Lee, Y.S. (2006). Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infectious Diseases* 6, 25.

Claus, H.; Maiden, M. C.; Wilson, D. J.; McCarthy, N. D.; Jolley, K. A.; Urwin, R.; Hessler, F.; Frosch, M. and Vogel, U. (2005). Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 191, 1263-1271.

Cohn, A.C.; MacNeil, J.R.; Harrison, L.H.; Hatcher, C.; Theodore, J.; Schmidt M and *et al*. (2010).Changes in *Neisseria meningitidis* disease epidemiology in the United States, 1998-2007: implications for prevention of meningococcal disease. *Clin Infect Dis.*;50(2):184-91.

Colledge, N.R.; Walker, B.R. and Ralston, S.H. (2010). Davidson's principles and practice of medicine. 21st ed. *Elsevier*.

Corless, C.E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Fox, A.J. and Kaczmarski, E.B.(2001). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in

suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*.;39:1553–1558.

Davison, K.L. and Ramsay, M.E.(2003). The epidemiology of acute meningitis in children in England and Wales. *Arch Dis Child*;88(8):662-4.

Deeudom, M.(2007). The electron transport chains of *Neisseria meningitides* . ph.D. Thesis ,Department of Bio. ,York University ,UK,223pp.

Dhamija,R.M. and Jaideep,B. (2006). Bacterial meningitis (meningoencephalitis) :a review .*JIACM*; 7:225-235.

Dubos, F.; De la Rocque, F.; Levy, C.; Bingen, E.; Aujard, Y.; Cohen, R.; Breart, G.; Gendrel, D. and Chalumeau, M. (2008). Sensitivity of the bacterial meningitis score in 889 children with bacterial meningitis. *J. Pediatr*.; 152:378-82.

Dunbar ,S.A.; Eason, R.A.; Musher, D.M. and Clarridge, J.E. (1998). Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* ;36:1617-1620.

Edmond, K. et al.,(2010). Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 10(5):317–328.

Eisenstein , BI. (1990). The polymerase Chain Reaction . A new diagnostic method of using molecular genetics for medical diagnosis . *N. Engl. J. Med*.; 322**:** 178-183.

Elizabith, J. Philips and Andrew, E. Simor.(1998). Bacterial meningitis in children & adults. The practical Peer-reviewed. *Journal for primary care physician*; 3(3):17-21.

Failace, L.; Wagner, M.; Chesky, M.; Scalco, R. and Jobim, L.F. (2005). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* and *Streptococcus* sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. *Arq. Neuropsiquiatr*, 63:920-4.

Feigin, R.D. and Pearlman, E. (2004). Bacterial meningitis beyond the neonatal period. In: Feigin RD, Demler GJ, Cherry JD, Kaplan SL, editors. Textbook of pediatric infectious diseases.5th ed. Philadelphia: *Saunders*; p. 443–74.

Fernandez-Rodriguez, A.; B. Alcala and R. Alvarez-Lafuente.(2008). Real time polymerase chain reaction detection of *Neisseria meningitidis* in formalin- fixed tissues from sudden deaths. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60: 339–346.

Figuero, J.E. and Densen, P.(1991). Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev*;4:359–95.

Finlay, F.O.; Witherow, H. and Rudd, P.T.(1995). Latex agglutination testing in bacterial meningitis .*Arch. Dis, Child*.;73:160-161.

Flier, M.; Geelen, J.; Kimpen, J.; Hoepelman, M. and Tuomaneny, E. (2003). Reprogramming the host response in bacterial meningitis. *Clin. Microb*. Rev. 16(3): 415-429.

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2002). Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology .11th edition .*Mosby* .p:502-509.

Forbes, B.A. ;Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.(2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology .12th ed. Mosby, *ASM* press ,Washington DC:447-455.

Frasch, C.E. (1989). Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Clin. Microbiol. Rev*. 2: S134–S138.

Frosch, M.; Muller, D.; Bousset, K. and Muller, A. (1992). Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun*;60(3):798–803.

Garrity, G.M. ;Brenner, D.J. ;Krieg, N.R.; Staley, J.T. et al,.(2005). Bergey's manual of systematic bacteriology :part C, the Alpha-Beta-Delta-and Epsilon proteobacteria.2nd edition.*springer*;2:774-797.

Ghotaslou,R. ; Farajnia, S. ;Yeganeh, F.; Abdoli-Oskouei, S.; Rezaee ,M.A. and Barzegar, M.(2012). Detection of acute childhood meningitis by PCR, Culture and Agglutination tests in Tabriz, Iran. *Acta. Medica.Iranica*.;50(3):192-196.

Ginsberg, L. (2004). Difficult and recurrent meningitis. *J. Neuro. Neurosurg. Psychia.* ,75 (1): 16–21.

Granert, C.; Abdalla, H.; Lind quist, L.; Diab, A.; Bahkiet, M.; Tracey, K. and Anderson, J. (2000). Suppression of macrophage activation with CN.-1493 increase survival in infant rat, with systemic *Haemophilus* infection. *Infect .and Immun*. 68(9): 5329-5334.

Granoff, D.M.; Feavers, I.M. and Borrow, R.(2003). Meningococcal vaccines. In: Plotkin, S.A.; Orenstein, W.A.; Offit, P.A. *Vaccines*. Philadelphia: *Saunders*; 4th ed.:959–987.

Granoff, D.M.; Harrison, L.H. and Borrow, R. (2008*)*. Meningococcal vaccines In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. Philadelphia, PA: *Saunders Elsevier*; 5th ed.:399–434.

Gray, L. and Fedorko, D. (1992). Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin. Microb. Rev*. 5(2): 130-145.

Gray, S.J.; Trotter, C.L.; Ramsay, M.E.; Guiver, M.; Fox, A.J.; Borrow, R.; Mallard, R.H. and Kaczmarski, E.B. (2006). Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J Med Microbiol*, 55(Pt 7):887-896.

Greenwood, D. ; Slack, R. ; Peutherer, M. and Barer, M. (Eds.) . (2007). Medical Microbiology .17th edition. Churchill Livingstone, *Elsevier*.

Guiver, M. and Borrow, R. (2001).PCR diagnosis. In: Pollard AJ, Maiden CJ, eds. Meningococcal Disease: Methods and Protocols. Totowa, N.J.: *Humana* Press.

Guiver, M.; R. Borrow; J. Marsh; S. J. Gray,;E. B. Kaczmarski; D. Howells; P. Boseley and A. J. Fox. (2000) . Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 28:173–179.

Harley, J.P. and Prescott, L.M. (1996). Labratory Exercises in Microbiology. 3rd ed .McGraw–Hill publishing company. New York.

Harrison, L.; Trotter, C.L. and Ramsay, M.E. (2009). Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 27S:51-63.

Hassan, A.H.(2011). Epidemiological Study of Meningitis Cases Admitted to AL-Razi Hospital in Diyala Governorate for the Period 2000 – 2004. *Diyala Journal of Medicine*;1(2):6-12.

Hay,W.; Hayward,A.; Levin, M. and Sondheimer,J,.(2001).CURRENT PEDIATRICS DIAGNOSIS & TREAMENT, 15th edition, *LANGE MEDICAL BOOKS*/Mc GRAW-HILL, U.S.A, PP 768-772.

He, Q.; M. Marjamaki; H. Soini; J. Mertsola, and M. K. Viljanen. (1994). Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Bio. Techniques*; 17**:**82, 84, 86–87.

Hedberg, S. T.; P. Olcen; H. Fredlund and P. Molling. (2009). Real-time PCR detection of five prevalent bacteria causing acute meningitis. *APMIS*;117: 856–860.

Hung, M.C. and Christodoulides, M.(2013). The Biology of *Neisseria* Adhesion ,*Biology* ;2 :1054-1109;doi:10.3390.

Hussein, A. S. and S. D. Shafran.(2000). Acute bacterial meningitis in adults. A 12-year review. *Medicine* (Baltimore) 79:360–368.

Indiana State Department of Health (ISDH). (2012).epidemiology resource center ,*Neisseria meningitides* ,Investigation and Reporting Resource Manual:39.

Johnston, M.; Zakharov, A.; Papaiconomou, C.; Salmasi, G. and Armstrong, D. (2004). Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, nonhuman primates and other mammalian species. Cerebrospinal Fluid Research 1:2.

Kaczmarski, E. B.; P. L. Ragunathan; J. Marsh; S. J. Gray and M.Guiver. (1998) . Creating a national service for the diagnosis of meningococcal disease by polymerase chain reaction. *Commun. Dis. Public Health* 1:54–56.

Kaldor,J. ;Asznowicz, R. ;*et al*.(1977).Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections ,with special reference to patients with meningitis and septicemia. *Amer. J. Clin. Path*.,68:284.

Katz, L. S.(2010). Computational tools for molecular epidemiology and computational genomics of *Neisseria meningitidis* .ph.D. Thesis, Georgia institute of Technology/Bioinformatics ,213pp.

Kolmodin, L.A. and Birch, D.E. (2002). Polymerase Chain Reaction Basic Principles and Routine Practice.PCR Cloning Protocols. 2nd Edition. *Humana Press Inc*.USA;192 :3-18

Kristiansen, F.; Ask, E.; Jenkins, A. *et al*. (1991) .Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* ;337: 1568−1579.

Kumar, P. and Clark, M. (2006). Clinical medicine. 6th ed. Saunders Ltd.

La Scolea, L. Jr. and Dryja, D.(1984). Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood with meningitis and its diagnostic significance. *J. Clin.Microbiol*.;9:187-190.

Leone, S. ; Silipo, A.; Nazarenko, E. L.; Lanzetta, R.; Parrilli, M. & Molinaro, A. (2007). Molecular structure of endotoxins from gram-negative marine bacteria :an update. *Mar. Dru*.; 5:85-112.

Lewis,L.A. ;Ram,S. ;Prasad,A. ;Gulati, S. ;Getzlaff, S.;Blom, A. M. ;Vogal,V. and Ric ,P.A.(2008) .Defining Targets for complement components C4b and C3b on the pathogenic *Neisseriae .Infect. Immun*. ;76(1):339-350.

Linton, S.M. and Morgan ,B.P.(1999).Properdin deficiency and meningococcal disease-identifying those most at risk. *Clin. Exp. Immunol*.;118(2):189-191.

Lomholt, H.; K. Poulsen and M. Kilian. (1995). Comparative characterization of the *iga* gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol*.; 15**:**495–506.

Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006). Brock Biology of Microorganism. 11th Edition. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, p992.

Manchanda, V.; Gupta, S. and Bhalla, P.(2006). Meningococcal disease :history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestation, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J. Med. Microbiol*.;24(1):7-19.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.(eds.).(1982). Molecular cloning :a laboratory manual .Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory:156-163.

Mantini, F.H. (1989). Fundamentals of anatomy and physiology. 5th ed. Prentice Hall:945.

Marchandin, H.; Ventura, V.; Alonso, J.M. and Van de Perre, P .(2005). Mixed Bacterial Meningitis Due to *Streptococcus pneumoniae* and

Neisseria meningitidis in an 18-Month-Old Child. *J. Clin. Microbiol*., 43: 1477-1479.

Marten-Organza; Bustamante-Martine, Z. C. ;Fernandez-Armayor, A.J.O.V. and Moreno-Martinez, J.M. (2002). Neuroscience in al-Andalusia and it is influence on medieval scholastic medicine, *Reviota de neurologic*; 34 :877-892.

Mayo Foundation for Medical Education and Research(MFMER), (2007). Mayo Clinic Staff, infectious disease , meningitis.

Melegaro, A.; Edmunds, W.J.; Pebody, R.; Miller, E. and George, R. (2006). The current burden of pneumococcal disease in England and Wales. *J Infect*.;52:37–48. DOI: 10.1016/j.jinf.2005.02.008

Meningitis Research foundation offices,(2007). Types and causes of meningitis , England and Wales.

Mistry, D. & Stockley, R. A. (2006). IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol;* 38: 1244-1248.

Mllonovich, L. M. (2007). Meningococcemia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Journal of Pediatric Health Care;* 21: 75-80.

Mothershed, E.A.; Sacchi, C.T.; Whitney, A.M.; Barnett, G.A.; Ajello, G.W.; Schmink, S. and *et al*.,(2004).Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*;42:320–8.

Murray, P.R. *et al*.,(editors).(2007).Manual of clinical microbiology,9th ed., *A S M* press.

Nassif, X.; Beretti, J.L.; Lowy, J.; Stenberg, P.; Ogaora, P.; Pfeifer, J.; Normark, S. and So, M. (1994). Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; *91*: 3769–3773.

National Institute for Health and Clinical Excellence,(NICE) , (2010).Management of bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children and young people younger than 16 years in primary and secondary care, clinical guideline 102, London, www.nice.org.uk

Newcomb, J.; Cartwright, K. ;Palmer, W.H. and Macfadden,J.(1996).PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J. Clin .Microbiol*.;34:1637-1640.

Ni, N.H.; Knight, A.l.; Cartwright, K. *et al*. (1992).Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet*;340: 1432−1434.

Nicolas, P.; Barker, N.and Al-Awaidy, S. (2005). Pharyngeal carriage of serogroup w133 *N.meningitis* in Hajjes and their family contact in Morocco, Oman and Sudan. *APMIS*: 182-6.

Pahari , A.; Pal, C. and Lyall, H. (2004). Recurrent meningitis is association with common variable immune deficiency. *Indi. Pediatr*. 1: 1152-1154.

Pandit, L.; Kumar, S.; Karunasager, I. and Karunasager, I.(2005). Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. *J. Med. Microbiol*. ;54:539-542.

Papavasileiou, K.; Papavasileiou, E.; Tzanakaki, G. *et al*. (2011).Acute bacterial meningitis cases diagnosed by culture and PCR in a children's hospital throughout a 9-year period (2000-2008) in Athens, Greece. *Mol. Diagn. Ther*.; 15: 109−113.

Patel, S.R. ;Arnold, K.E. ;Drenzek, C.L. and Lance, S.(2008).GEORGIA bacterial meningitis &sepsis investigation & control manual. Georgia Department of Human Resources. 1st edition:29

Pathan, N.; Faust, S.N. and Levin, M. (2003). Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child*.;88:601–7. DOI: 10.1136/adc.88.7.601

Patricia Skinner (2001).SSNANI -TIBBI, Encyclopedias of ALTERNATIVE MEDICINE.

Peltola, H. (2000). Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*.;13:302–17. DOI: 10.1128/CMR.13.2.302-317.2000.

Perkin ,R.M. ;Newton ,D.A. and Swift ,J.D.(2007). Pediatric Hospital Medicine: Textbook of Inpatient Management .2nd ed.; Lippincott Williams &Wilkins:924.

Persson ,K.; Ly, H. D.; Dieckelmann ,M. ; Wakarchuk ,W.W.; Withers ,S. and Strynadka, N.C.J.(2001). Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitides* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nature Structural Biology* .8(2):166-175.

Pollard, A.J.; Probe, G.; Trombley, C.; Castell, A.; Whitehead, S. ;Bigham, J.M. *et al*.(2002).Evaluation of a Diagnostic polymerase chain reaction assay for *Neisseria meningitidis* in north America and field experience during an outbreak. *Arch. Pathol .Lab. Med*.;126:1209-1215.

Poltorak, A.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Citterio, S.; *et al*.(2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci* U S A;97:2163–7.

Popovic, T.; Ajello, G. and Facklam, R.(1999).WHO laboratory Manual for the diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae, and *Haemophilus influenzae*. Geneva: World Health Organization.

Prober, C.G. (2004). Central nervous system infection. Behrman R.E(ed): Nelson text book of Pediatrics. 17th ed., Philadelphia, WB Saunders,: 2038-2048.

Racoosin, J. A.; Whitney, C. G.; Conover, C. S. & Diaz, P. S. (1998). Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. *JAMA;* 280: 2094-2098.

Raetz, C. R. H. ; Reynolds, C. M. ; Trent, M. S.& Bishop, R. E. (2007). Lipid a modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem*.; 76:295-329.

Raghunathan,P.L.;Bernhardt,S.A. and Rosenstein, N.E. (2004). Opportunities for control of meningococcal disease in the United States. *Annu Rev Med*;55:333–53.

Rapley, R. (2002). Molecular Analysis and Amplification Techniques. Molecular Biology and Biotechnology .4th ed. The Royal Society of Chemistry.UK.

Reddy, K.R. (2010). Microbiology &Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

Requejo, H. I. ; Nascimento, G.M.and Fahrat, C. K. (1992). Comparison of counter immunoelectrophoresis latex agglutination and bacterial culture for the diagnosis of bacterial meningitis using urin , serum, and csf. *Braz. J. Med. Biol. Res*.; 25(4): 357-377.

Richards,P.G. and Towu-Aghantse,E.(1986). Dangers of lumber puncture.*BMJ*;292:605-606.

Robinson, K.; M. Taraktsoglou; K. S. J. Rowe; K. G. Wooldridge and D. A. A. Ala'Aldeen.,(2004). Secreted proteins from *Neisseria meningitidis* mediate differential human gene expression and immune activation Cell. *Microbiol*.; 6**:**927–938.

Rosenstein, N.E. and Perkins, B.A.(2000). Update on *Haemophilus influenzae* serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin North Am*;47:337–52.

Rosenstein, N.E.; Perkins, B.A.; Stephens, D.S.; Popovic, T. and Hughes, J.M. (2001). Meningococcal disease. *N Engl J Med*;344:1378–88.

Saez-Liorens, X. and G. H. McCracken (2003). Bacterial meningitis in children. *Lancet*; 361:2139–2148.

Sainsbury, S.,;Ren, J.; Nettleship, J. E.; Saunders ,N. J. I.; Stuart, D. and Owens, R. J.(2010). The structure of a reduced form of OxyR from *Neisseria meningitides*, BMC Structural Biology; 10:10 http://www.biomedcentral.com/1472-6807/10/10

Saravolatz, L.D.;Manzor, O.; VanderVelde, N.; Pawlak, J. and Belian, B. (2003). Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. *Clin. Infect. Dis*., 36:40-45.

Schuurman, T.; de Boer, R.F.; Kooistra-Smid, A.M. and van Zwet, A.A.(2004). Prospective study of use of PCR amplification and sequencine of 16s ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting .*J Clin Microbiol*;42(2):734-40.

Seehusen, D. A.; Reeves, M. M. and Fomin, D. A.(2003).Cerebrospinal Fluid Analysis. *American Family Physician*; Hawaii ;68(6):1103-1109.

Seward, R.J. and Towner, K.J.(2000). Evaluation of a PCR-immunoassay technique for detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid and peripheral blood. *J. Med. Microbiol*.;49:451-456.

Shapera, M. and Leib, S. L. (2003). Differential effect of P47 phox and gP19 deficiency on the course of pneumococcal meningitis. *Infect. and Immun. J*. 71(7): 4087-4092.

Sinnatamby, C.S. and Last, R.J. (2006).Last's anatomy: regional and applied. 11th ed. Churchill Livingston:568.

Snell (2003). *CLINICAL ANATOMY*, 3rd edition, PP 90-95.

Solbrig, M. V.; Healy, J. F. & Jay, C. A. (2000). Infections of the nervous system. In Neurology in Clinical Practice, pp. 1317–1351. Edited by W. G. Bradley, R. B. Daroff, G. M. Fenichel & C. D. Marsden. Boston: Butterworth–Heinemann.

Song, W.X.; L. Ma; R.W. Chen and D.C. Stein.(2000). Role of lipooligosaccharide in Opa-independent invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *J. Exp. Med*. 191: 949–959.

Stephens, D. S.(2007). Conquering the meningococcus. FEMS. *Microbiol. Rev*. 31**:**3–14.

Stephens, D. S.; Greenwood ,B. and Brandtzaeg, P. (2007). Epidemic meningitis, meningococcaemia and *Neisseriae meningitidis .Lancet* ;369 (9580):2196-210.

Stephens, D. S. (2009). Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27 (Suppl. 2):B71–77.

Stork, M.; Bos, M.P.; Jongerius, I.; de Kok, N.; Schilders, I., et al. (2010). An Outer Membrane Receptor of *Neisseria meningitidis* Involved in Zinc Acquisition with Vaccine Potential. *PLoS Pathog* 6(7): e1000969. doi:10.1371/journal.ppat.1000969

Surinder, K.;Bineeta, K. and Megha, M.(2007). Latex particle agglutination test as an adjunct to the diagnosis of bacterial meningitis.; 25:395-397.

Taha, M. K.; J. M. Alonso; M. Cafferkey; D. A. Caugant; S. C. Clarke; M. A. Diggle; A. Fox; M. Frosch; S. J. Gray; M. Guiver; S. Heuberger; J. Kalmusova; K. Kesanopoulos; A. M. Klem; P. Kriz; J. Marsh; P. Molling; K. Murphy; P. Olcen; O. Sanou; G. Tzanakaki and U.

Vogel.(2005) . Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol*. 43:144–149.

Tan, L.K.; Carlon, G.M. and Borrow, R.(2010). Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med* ,362 (16):1511-1520.

Tebruegge, M. and Curtis, N. (2008). Epidemiology, etiology, pathogenesis, and diagnosis of recurrent bacterial meningitis. *Clin. Microbiol. Rev*., 21:519-37.

Teh ,C.S.J.; Chua ,K.H. and Thong ,K.L. (2009). Simultaneous differentiation detection of human pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on gyrB and pntA genes.*J. Applied Microbiol*. 108:1940-1945.

Theilen ,U. ; Wilson, L. ; Wilson ,G. ; Beattie ,J.O. ; Qureshi ,S. and Simpson,D. (2008). Management of invasive meningococcal disease in children and young people: Summary of SIGN guidelines. *BMJ* (Clinical research ed.) 336 ,(7657): 1367–70.

Thomas, K.; Hasbun, R.; Jekel, J. and Quagliareiio, V.(2002). The diagnostic accuracy of Kernig sign, Brudzinski sign & nuchal rigidity in adult with suspected meningitis. *Clin Infant Dis*; 35 (1): 46-52.

Todar, K.(Ed.).(2002). Immune define against microbial pathogens. Todar's online textbook of bacteriology: University of Wisconsin-Madison. Dep. Bacteriology.

Todar ,Kenneth .(2006).Meningococcal meningitis; Todar's On line Textbook Of Bacteriology .University of Wisconsin-Madison. Dept. of Bacteriology.

Todar, K.(Ed.).(2008). Mechanism of bacterial pathogenicity; protein Toxins. Text book of bacteriology. University of Wisconsin-Madison.

Trainor, J.L.; Hampers, L.C.; Krug, S.E. *et al*. (2001).Children with first time simple febrile seizures are at low risk of serious bacterial illness. *Acad. Emerg. Med*.; 8: 781−787.

Trotter, C.L. and Greenwood, B.M.(2007).Meningococcal carriage in the African meningitis belt. *Lancet Infect Dis*,7(12):797-803.

Tunkel, A.R. and Scheld, W.M. (1997). Issue in the management of bacterial meningitis. *Am. Fam. Phys*. 56(5):1355-62.

Tunkel, A.R. and Scheld, W.M. (2005) .acute meningitis . In GL Mandell *et al*., eds., Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of infectious Diseases, 6th ed., pp.1083-1126. Philadelphia: *Elsevier* Churchill Livingstone.

Tunkel, A.R.; Harman B.J.; Kaplan S.I.; et al., (2004) .Practice Guidelines for the management of Bacterial Meningitis. *Clinical infectious Diseases*; 39(9): 1267-84.

Underwood, J.C.E.(2004).General and Systematic Pathology. In: Ironside J.W., Moss T. ,Louis D. N. ,Lowe J. S. ,Weller R. O.(eds.), Diagnostic pathology of nervous system tumours., Churchill Livingstone ,Edinburgh . PA: *Saunders Elsevier*;4th ed.:741-792.

Van de Beek, D. ;de Gans, J. ;Spanjaard, L. ; Weisfelt, M. ; Reitsma, J.B. and Vermeulen , M.(2004). Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. New Eng. *J. Med*. , 35 (18): 1849–59.

van Deuren, M.; P. Brandtzaeg and J. W. van der Meer.(2000). Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Rev*. 13**:**144–166.

Vasanthakumari, R.(2007).Text book of microbiology. *Neisseria* and *Branhamella* ; BI publications Pvt Ltd, NewDelhi :202-203.

Virji, M. (2009). Pathogenic *Neisseriae*: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol T,* 274-286.

Vyse, A. ;Wolter, J.M. ;Chen, J. ;Ng, T. and Soriano-Gabarro, M.(2011).Meningococcal disease in Asia :an under-recognized public health burden. *Epidemiol.Infect*.,139:967-985.

Waugh, A. and Grant, A. (2010). Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness. 11th ed. Churchill Livingston.

Welinder-Olsson, C.; Dotevall, L.; Hogevik, H.; Jungnelius, R.; Trollfors, B.; Wahl, M. and Larsson, P. (2007). Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin. Microbiol. Infect*., 13:879-86.

World Health Organization.(2003). Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world, Bacterial agents of pneumonia and meningitis, *Neisseria meningitides*;WHO/CDC,Geneva:29-43.

World Health Organization.(2006).Outbreak news. Meningococcal disease, African meningitis belt, epidemic season2006. *Wkly Epidemiol Rec*.;81:119–20

World Health Organization.(2010a). Meningitis Fact sheet N 141. Revised February 2010. (Accessed 6 July, 2010). Available at: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/

World Health Organization.(2010b). Global Alert and Response: Meningococcal Disease: situation in the African Meningitis Belt. 25 March 2009. [Accessed 6 July,2010]. Available at: http://www.who.int/csr/don/2009_03_25/en/index.html

World Health Organization .(2011).Background paper on meningococcal vaccines , WHO Strategic Advisory Group of Experts on Immunization,

Geneva.
www.who.int/immunization/sage/1_mening_background_document_v5_3__ apr_2011.pdf, accessed November 2011).

World Health Organization, Eastern Mediterranean Regional Office .(2013). Meningococcal disease in south Sudan .1-4 .Available at: www.emro.who.int/.../meningococcal-ss-june-2013.htm...

Wu, H.J.; Wang, A.H.J. and Jennings, M.P.(2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria .*Curr.Opin.Chem.Biol*.,Elsevier;12:1-9.

Wylie, P.; Stevens, D.; Drake, W.; Stuart, J. and Cartwright, K.(1997). Epidemiology and clinical management of meningococcal disease in Gloucestershire: retrospective, population based study.*Br Med J*.,315:77479.

Yamasaki, R.; D.E. Kerwood; H. Schneider; K.P. Quinn; J.M. Griffiss and R.E. Mandrell. (1994). The structure of lipooligosaccharide produced by *Neisseria gonorrhoeae*, strain-15253, isolated from a patient with disseminated infection—evidence for a new glycosylation pathway of the gonococcal lipooligosaccharide. *J. Biol. Chem*. 269: 30345–30351.

Zlokovic, B.V.(2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders .*Neuron*;57:178-201;PMID:18215617; http://dx.doi.org/10.1016/.

الملحق (1)

نتائج اختبار البادئات باستخدام اختبار Insilico لتضخيم البادئ بتطبيقه على اغلب الانواع البكتيرية المسببة لمرض السحايا :

A- اظهر الاختبار على بكتريا الـ *Neisseria* ظهور الحزم Bands لكل الانواع المدرجة ماعدا الانواع المرقمة (15,12,4,3,2,1)

ت	انواع وسلالات البكتيريا
1-	*Neisseria gonorrhoeae* FA 1090
2-	*Neisseria gonorrhoeae* NCCP11945
3-	*Neisseria gonorrhoeae* TCDC-NG08107
4-	*Neisseria lactamica* 020-06
5-	*Neisseria meningitidis* 053442
6-	*Neisseria meningitidis* 8013
7-	*Neisseria meningitidis* FAM18
8-	*Neisseria meningitidis* G2136
9-	*Neisseria meningitidis* H44/76
10-	*Neisseria meningitidis* M01-240149
11-	*Neisseria meningitidis* M01-240355
12-	*Neisseria meningitidis* M04-240196
13-	*Neisseria meningitidis* NZ-05/33
14-	*Neisseria meningitidis* WUE 2594
15-	*Neisseria meningitidis* alpha14
16-	*Neisseria meningitidis* alpha710
17-	*Neisseria meningitidis* serogroup A strain Z2491
18-	*Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58

B- نتائج اختبار البادئ على بكتريا الـ *Haemophilus* اظهر عدم وجود الحزم لكل الانواع التابعة لها :

ت	انواع وسلالات البكتريا
1-	*Haemophilus ducreyi* 35000HP
2-	*Haemophilus influenzae* 10810
3-	*Haemophilus influenzae* 86-028NP
4-	*Haemophilus influenzae* F3031
5-	*Haemophilus influenzae* F3047
6-	*Haemophilus influenzae* PittEE
7-	*Haemophilus influenzae* PittGG
8-	*Haemophilus influenzae* R2846
9-	*Haemophilus influenzae* R2866
10-	*Haemophilus influenzae* Rd
11-	*Haemophilus parainfluenzae* T3T1
12-	*Haemophilus parasuis* SH0165
13-	*Haemophilus somnus* 129PT
14-	*Haemophilus somnus* 2336

C- نتائج اختبار البادئ على بكتريا الـ *Streptococcus* اذ لم تظهر الحزم لكل الانواع التابعة لها :

ت	انواع وسلالات البكتريا	ت	انواع وسلالات البكتريا
1-	*Streptococcus agalactiae* 2-22	7-	*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12394
2-	*Streptococcus agalactiae* 2603V/R	8-	*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 chromosome
3-	*Streptococcus agalactiae* A909	9-	*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* RE378
4-	*Streptococcus agalactiae* GD201008-001	10-	*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* AC-2713
5-	*Streptococcus agalactiae* NEM316	11-	*Streptococcus equi* subsp. *equi* 4047
6-	*Streptococcus agalactiae* SA20-06	12-	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

13-	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 35246	38-	*Streptococcus pneumoniae* CGSP14
14-	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* str. MGCS10565	39-	*Streptococcus pneumoniae* D39
15-	*Streptococcus gallolyticus* UCN34	40-	*Streptococcus pneumoniae* G54
16-	*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143	41-	*Streptococcus pneumoniae* Hungary19A-6
17-	*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC BAA-2069	42-	*Streptococcus pneumoniae* INV104
18-	*Streptococcus gordonii* str. Challis substr. CH1	43-	*Streptococcus pneumoniae* INV200
19-	*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18	44-	*Streptococcus pneumoniae* JJA
20-	*Streptococcus iniae* SF1	45-	*Streptococcus pneumoniae* OXC141
21-	*Streptococcus intermedius* JTH08	46-	*Streptococcus pneumoniae* P1031
22-	*Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198	47-	*Streptococcus pneumoniae* R6
23-	*Streptococcus mitis* B6	48-	*Streptococcus pneumoniae* SPNA45
24-	*Streptococcus mutans* GS-5	49-	*Streptococcus pneumoniae* ST556
25-	*Streptococcus mutans* LJ23	50-	*Streptococcus pneumoniae* TCH8431/19A
26-	*Streptococcus mutans* NN2025	51-	*Streptococcus pneumoniae* TIGR4
27-	*Streptococcus mutans* UA159	52-	*Streptococcus pneumoniae* Taiwan19F-14
28-	*Streptococcus oligofermentans* AS 1.3089	53-	*Streptococcus pneumoniae* gamPNI0373
29-	*Streptococcus oralis* Uo5	54-	*Streptococcus pseudopneumoniae* IS7493
30-	*Streptococcus parasanguinis* ATCC 15912	55-	*Streptococcus pyogenes* A20
31-	*Streptococcus parasanguinis* FW213	56-	*Streptococcus pyogenes* Alab49
32-	*Streptococcus parauberis* KCTC 11537	57-	*Streptococcus pyogenes* M1 476 DNA
33-	*Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144	58-	*Streptococcus pyogenes* M1 GAS
34-	*Streptococcus pneumoniae* 670-6B	59-	*Streptococcus pyogenes* MGAS10270
35-	*Streptococcus pneumoniae* 70585	60-	*Streptococcus pyogenes* MGAS10394
36-	*Streptococcus pneumoniae* AP200	61-	*Streptococcus pyogenes* MGAS10750
37-	*Streptococcus pneumoniae* ATCC 700669	62-	*Streptococcus pyogenes* MGAS15252

63-	*Streptococcus pyogenes* MGAS1882	82-	*Streptococcus suis* D9
64-	*Streptococcus pyogenes* MGAS2096	83-	*Streptococcus suis* GZ1
65-	*Streptococcus pyogenes* MGAS315	84-	*Streptococcus suis* JS14
66-	*Streptococcus pyogenes* MGAS5005	85-	*Streptococcus suis* P1/7
67-	*Streptococcus pyogenes* MGAS6180	86-	*Streptococcus suis* S735
68-	*Streptococcus pyogenes* MGAS9429	87-	*Streptococcus suis* SC070731
69-	*Streptococcus pyogenes* NZ131	88-	*Streptococcus suis* SC84
70-	*Streptococcus pyogenes* SSI-1	89-	*Streptococcus suis* SS12
71-	*Streptococcus pyogenes* str. *Manfredo*	90-	*Streptococcus suis* ST1
72-	*Streptococcus pyogenes* strain MGAS8232	91-	*Streptococcus suis* ST3
73-	*Streptococcus salivarius* 57.I	92-	*Streptococcus suis* TL13
74-	*Streptococcus salivarius* CCHSS3	93-	*Streptococcus thermophilus* CNRZ1066
75-	*Streptococcus salivarius* JIM8777	94-	*Streptococcus thermophilus* JIM 8232
76-	*Streptococcus sanguinis* SK36	95-	*Streptococcus thermophilus* LMD-9
77-	*Streptococcus suis* 05ZYH33	96-	*Streptococcus thermophilus* LMG 18311
78-	*Streptococcus suis* 98HAH33	97-	*Streptococcus thermophilus* MN-ZLW-002
79-	*Streptococcus suis* A7	98-	*Streptococcus thermophilus* ND03
80-	*Streptococcus suis* BM407	99-	*Streptococcus uberis* 0140J
81-	*Streptococcus suis* D12		

D- نتائج اختبار البادئ على بكتريا الـ*Staphylococcus* اظهر عدم وجود الحزم لكل الانواع

التابعة للبكتريا :

ت	انواع وسلالات البكتريا	ت	انواع وسلالات البكتريا
1-	*Staphylococcus aureus* 04-02981	4-	*Staphylococcus aureus* RF122
2-	*Staphylococcus aureus* 08BA02176	5-	*Staphylococcus aureus* strain Mu50
3-	*Staphylococcus aureus* M1	6-	*Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* 11819-97

7-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 71193	30-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 16125
8-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL	31-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 18341
9-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ECT-R 2	32-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 18412
10-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ED133	33-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 18583
11-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ED98	34-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* T0131
12-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* HO 5096 0412	35-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* TCH60
13-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1	36-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* TW20
14-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9	37-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_FPR3757
15-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JKD6159	38-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516
16-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* LGA251	39-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* VC40
17-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* M013	40-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* str. JKD6008
18-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MRSA252	41-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* str. Newman
19-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MSHR1132	42-	*Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* TM300
20-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MSSA476	43-	*Staphylococcus epidermidis* ATCC_12228
21-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MW2	44-	*Staphylococcus epidermidis* RP62A
22-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu3	45-	*Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435
23-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315	46-	*Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01
24-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325	47-	*Staphylococcus lugdunensis* N920143
25-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* S0385	48-	*Staphylococcus pseudintermedius* ED99
26-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 10388	49-	*Staphylococcus pseudintermedius* HKU10-03
27-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 10497	50-	*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*
28-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 15532	51-	*Staphylococcus warneri* SG1
29-	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ST228 complete genome, isolate 16035		

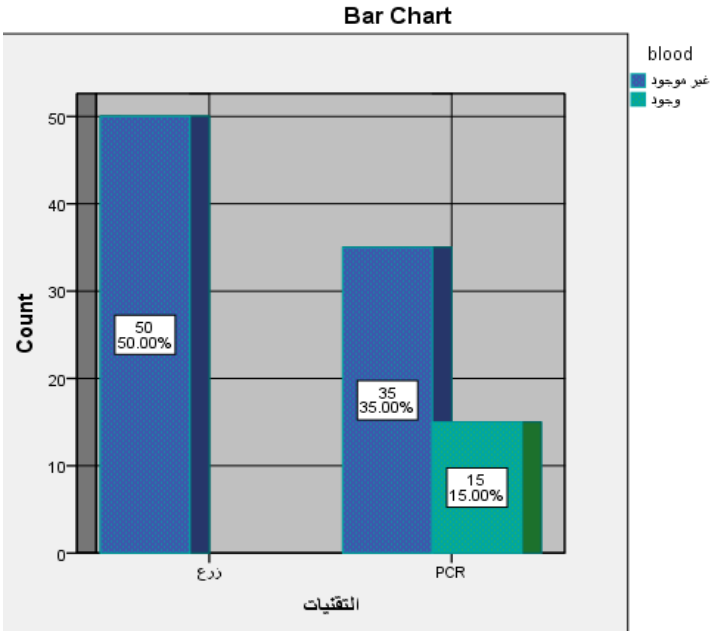
E- نتائج اختبار البادئ على بكتريا الـ *Klebsislla* اظهر عدم وجود الحزم لكل الانواع التابعة لها :

ت	انواع وسلالات البكتريا
1-	*Klebsiella oxytoca* E718
2-	*Klebsiella oxytoca* KCTC 1686
3-	*Klebsiella pneumoniae* 342
4-	*Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242
5-	*Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044
6-	*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 1084
7-	*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286
8-	*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578
9-	*Klebsiella variicola* At-22

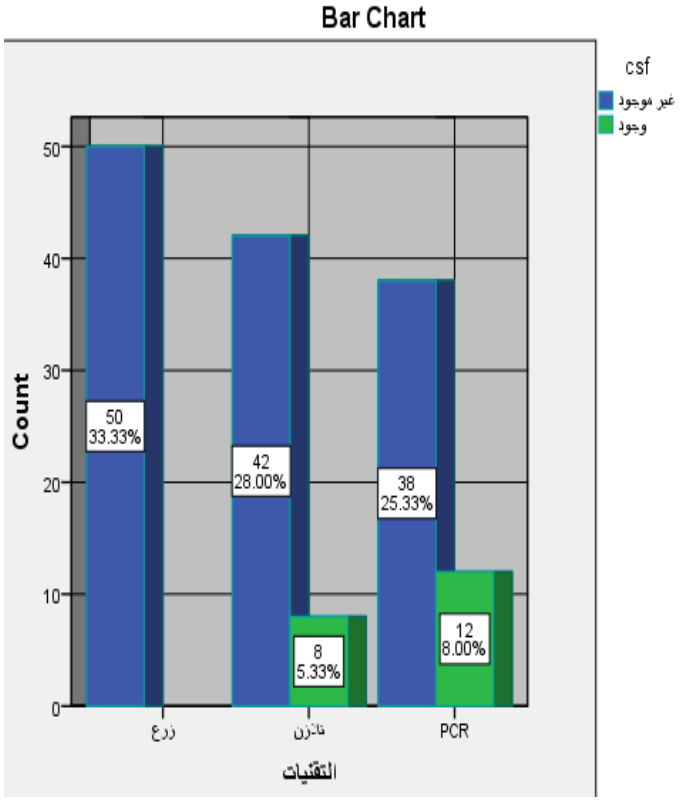
F- نتائج اختبار البادئ على بكتريا الـ *Escherichia* اظهر عدم وجود الحزم لكل الانواع التابعة لها :

ت	انواع وسلالات البكتريا	ت	انواع وسلالات البكتريا
1–	*Escherichia blattae* DSM 4481	10-	*Escherichia coli* B str. REL606
2–	*Escherichia coli* 0127:H6 E2348/69	11-	*Escherichia coli* BL21(DE3)
3–	*Escherichia coli* 042	12-	*Escherichia coli* BL21(DE3)
4–	*Escherichia coli* 536	13-	*Escherichia coli* BL21-Gold(DE3)pLysS AG
5–	*Escherichia coli* 55989	14-	*Escherichia coli* BW2952
6–	*Escherichia coli* ABU 83972	15-	*Escherichia coli* CFT073
7–	*Escherichia coli* APEC O1	16-	*Escherichia coli* DH1
8–	*Escherichia coli* APEC O78	17-	*Escherichia coli* DH1
9–	*Escherichia coli* ATCC 8739	18-	*Escherichia coli* E24377A

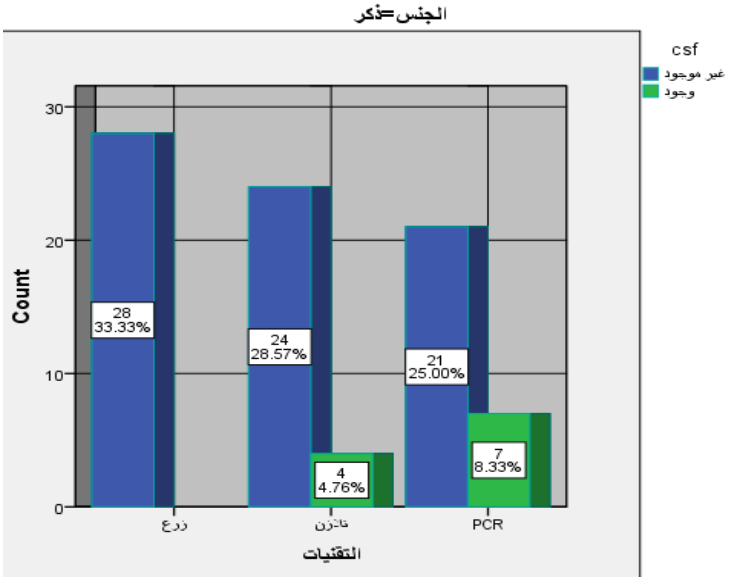
19-	*Escherichia coli* ED1a	41-	*Escherichia coli* O55:H7 str. RM12579
20-	*Escherichia coli* ETEC H10407	42-	*Escherichia coli* O7:K1 str. CE10
21-	*Escherichia coli* HS	43-	*Escherichia coli* O83:H1 str. NRG 857C
22-	*Escherichia coli* IAI1	44-	*Escherichia coli* P12b
23-	*Escherichia coli* IAI39	45-	*Escherichia coli* S88
24-	*Escherichia coli* IHE3034	46-	*Escherichia coli* SE11
25-	*Escherichia coli* K-12 substr. W3110	47-	*Escherichia coli* SE15
26-	*Escherichia coli* KO11FL	48-	*Escherichia coli* SMS-3-5
27-	*Escherichia coli* KO11FL	49-	*Escherichia coli* UM146
28-	*Escherichia coli* LF82	50-	*Escherichia coli* UMN026
29-	*Escherichia coli* NA114	51-	*Escherichia coli* UMNK88
30-	*Escherichia coli* O103:H2 str. 12009	52-	*Escherichia coli* UTI89
31-	*Escherichia coli* O104:H4 str. 2009EL-2050	53-	*Escherichia coli* W
32-	*Escherichia coli* O104:H4 str. 2009EL-2071	54-	*Escherichia coli* W
33-	*Escherichia coli* O104:H4 str. 2011C-3493	55-	*Escherichia coli* Xuzhou21
34-	*Escherichia coli* O111:H- str. 11128	56-	*Escherichia coli* str. K-12 substr. DH10B
35-	*Escherichia coli* O157:H7	57-	*Escherichia coli* str. K-12 substr. MDS42 DNA
36-	*Escherichia coli* O157:H7 EDL933	58-	*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655
37-	*Escherichia coli* O157:H7 str. EC4115	59-	*Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110
38-	*Escherichia coli* O157:H7 str. TW14359	60-	*Escherichia coli* str. clone D i14
39-	*Escherichia coli* O26:H11 str. 11368	61-	*Escherichia coli* str. clone D i2
40-	*Escherichia coli* O55:H7 str. CB9615	62-	*Escherichia fergusonii* ATCC 35469



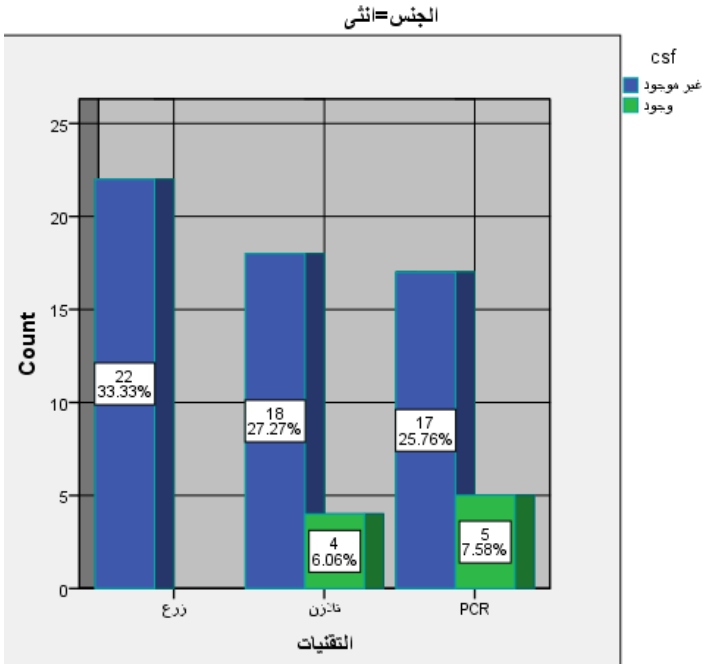
ملحق(2) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بطرائق الزرع البكتيري والـ PCR .



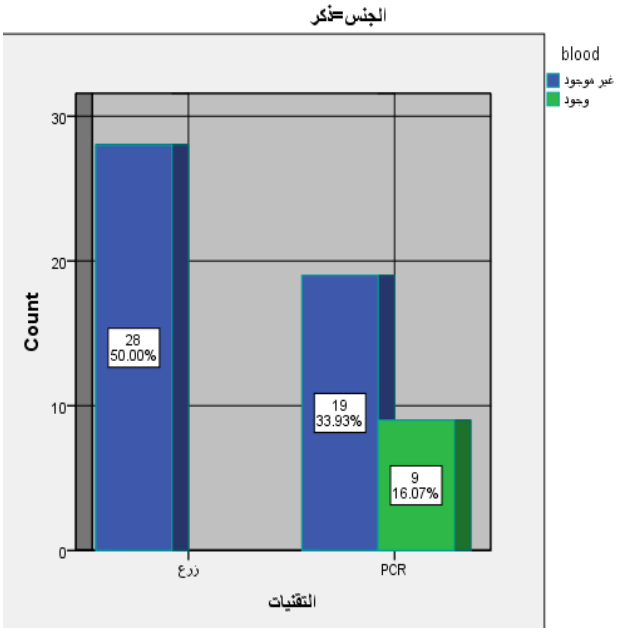
الملحق(3) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF باستخدام طرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR .



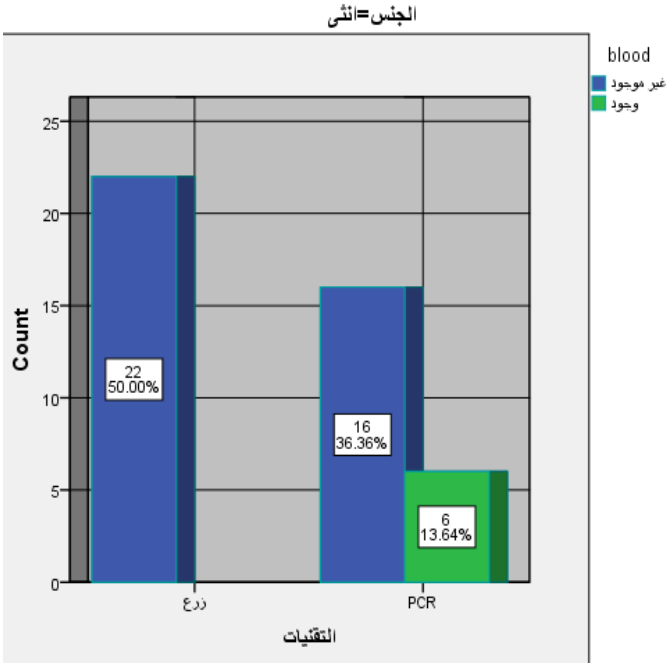
الملحق(4) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الـCSF للمرضى الذكور بطرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR .



الملحق (5) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N .meningitidis* في عينات الـ CSF للمرضى الإناث بطرائق الزرع البكتيري والتلازن والـ PCR .



الملحق(6) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم للمرضى الذكور بطرائق الزرع البكتيري والـ PCR .



الملحق(7) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N.meningitidis* في عينات الدم للمرضى الإناث بطرائق الزرع البكتيري وال PCR. .

Summary

The Meningitis of important disease as it gives some conditions as a result of culture negative in spite of the presence of symptoms and clinical inflammatory response was due to the treatment pre- antibiotic , so it was chosen this study to shed light on identifying diagnostic accuracy and clinical benefit of the methods used to detect for *Neisseria meningitidis* bacteria in samples of cerebrospinal fluid (CSF) and blood samples as a technique of polymerase chain reaction (PCR) method and compare it with the culture and method of routine agglutination test (Latex test).

50 CSF samples and 50 blood samples were collected of patients suspected infected with meningitis or septicemia outpatient hospital Karbala education for children and Hussein(AS) Hospital of education and who have been diagnosed clinically by specialist doctors at the hospital, since collected samples of the cerebrospinal fluid (CSF) of the samples that sent to a laboratory of bacteria in the hospital , as well as blood sample were withdrawn for the same people under study and admitted to the emergency unit or intensive care unit (ICU) or transitional diseases unit during the period 12.01.2012 until 05.01.2013 .

Sediment of the CSF samples and blood samples were cultured in traditional media, has also been examining the CSF supernatant using the agglutination test (LA) for the detection of capsular antigen is free from bacteria *N. meningitidis* , as well as the DNA was extracted from bacterial samples of CSF and blood for the purpose of detecting the presence of the ctrA gene using a technique the PCR.

The study results showed that the routine culture method gave the bacteriological test result negative rate of 0.0% for each of the samples of CSF and blood samples, while the resulting of agglutination test is to detect eight cases (16.0%) of the total samples of CSF, while the number of diagnosed cases enabled by the PCR technique 12 cases (24.0 %) of the total samples of CSF and 15 cases (30.0 %) of the total blood samples . well as the results showed high incidence of bacterial meningitis disease caused by *N. meningitidis* among males than females, with total cases in the blood sample of male patients by the way of PCR were nine cases (16.1%) and females six cases (13.6%) , while the total number of cases exist in samples of CSF by manner of agglutination test and PCR for male patients 11 cases (13.1 %) and females nine cases (13.6 %) .

In light of the presented results of the study conclude that the PCR technique is the way to the most efficient and the most accurate and useful in the detection of bacteria in samples of CSF and blood samples of patients with meningitis cases questionable , and better detection rate recorded in blood samples .

Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Karbala
College of Education for pure sciences
Department of Biology

Detection of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal fluid and Blood by PCR, Agglutination test and Bacterial Culture

A Thesis submitted to the College of Education of Karbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biology – zoology

By
Rana Abdul Hamza Al-Qarawee
B. Sc. Biology / 2003

Supervised By

Assist. Prof. D. Hiyame Abdul Ridha AL-awade

2013 A .D. **1435 A . H.**