

خمج الاغشية السحائية المتخفي وبعض اوجه المناعة الموضوعية والجهازية الخلطية

أطروحة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم - جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في
علوم الحياة - الأحياء المجهرية

من

ازهار عمران لطيف الذهب

اذار 2006 م

صفر-1427 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَإِذْ قَالَ إِبْرَاهِيمُ رَبِّ اجْعَلْ هَذَا الْبَلَدَ
ءَامِنًا وَأَجْنُبْنِي وَبَنِيَّ أَنْ نَعْبُدَ الْأَصْنَامَ)

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

((ابراهيم 35))

بسم الله الرحمن الرحيم

توصية الأستاذ المشرف

نشهد أن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :	التوقيع :
اسم المشرف: د. قاسم نجم عبيد الناصري	اسم المشرف : د. إبراهيم محمد سعيد شناوة
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد	المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان : كلية العلوم/جامعة بابل	العنوان : كلية العلوم /جامعة بابل
التاريخ:	التاريخ:

توصية رئيس القسم

إشارة إلى التوصية في أعلاه التي قدمها الأستاذ المشرف أحيل هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها

التوقيع :
اسم رئيس القسم: د. كريم حميد رشيد
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان : قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة بابل
التاريخ:

قرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة نشهد اننا قد اطلعنا على هذه الاطروحة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 20-5-2006 ووجدنا انها جديرة بالقبول بدرجة (جيد جدا) لنيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة / احياء مجهرية .

التوقيع : رئيس اللجنة: د.خيري عبد الله داود
المرتبة العلمية : استاذ
العنوان : كلية الطب البيطري/جامعة القادسية
التاريخ :

التوقيع : عضو اللجنة : عدنان حمد الحمداني
المرتبة العلمية : استاذ
العنوان : كلية الطب/جامعة القادسية
التاريخ :

التوقيع : عضو : عدنان مهران اوانيس
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : كلية الطب/جامعة الكوفة
التاريخ :

التوقيع : عضو اللجنة : عبد الله كاظم هندي
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : كلية العلوم/جامعة بابل
التاريخ :

التوقيع : عضو : هادي رسول المسعودي
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : كلية التربية/جامعة كربلاء
التاريخ :

التوقيع : المشرف : ابراهيم محمد سعيد ثناوة
المرتبة العلمية : استاذ
العنوان : كلية العلوم/جامعة بابل
التاريخ :

التوقيع : المشرف : قاسم نجم عبيد
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : كلية العلوم/جامعة بابل
التاريخ :

مصادقة عمادة كلية العلوم
اصادق على ماجاء في قرار اللجنة اعلاه :

الاسم : د.عودة مزعل الزالمي
المرتبة العلمية : استاذ
العنوان : عمادة كلية العلوم /جامعة بابل
التاريخ :

شكر وتقدير

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله على ما عرفنا من نفسه والهمنا من شكره وفتح من ابواب العلم بربوبيته ودلنا عليه من الاخلاص بتوحيده اجلالا وتباركا وشكرا على هدايته وتوفيقه لي لانجاز هذا الجهد واصلي واسلم على سيد المرسلين واله الطيبين الطاهرين.

لذا اتقدم بجزيل شكري وفائق تقديري الى استاذي الفاضل الدكتور ابراهيم محمد سعيد شناوه الذي كان لتوصياته القيمة وآرائه السديدة ومساعدته لي طيلة مدة دراسته الدور الفاعل في اعداد هذه الأطروحة .

واتقدم بالشكر والتقدير الى استاذي الفاضل الدكتور قاسم نجم عبيد لما ابداه من ملاحظات ودعم اثناء البحث.

شكري وتقديري الى رئاسة قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم ورئاسة جامعة بابل لاتاحتهم لي فرصة اكمال دراستي.

شكري وتقديري الى كافة العاملين في مختبر البكتريولوجي- مستشفى بابل للولادة والأطفال والأطباء الاختصاص لما أبدوه من عون اثناء مدة البحث. شكري وامتناني الى الدكتور اسعد الجنابي كلية الطب- جامعة الكوفة لجهده في قراءة المقاطع النسيجية.

شكري وتقديري إلى الدكتور Alan R.Cantwell, M.D.,Los Angeles,CA العنوان البريدي AlanCantwell@sbcglobal.net لمتابعته موضوع البحث وتزويدي بما هو جديد .واشكر زملائي طلبة الدراسات العليا والى من ساهم في طبع هذه الاطروحة واخيرا اشكر كل من مد يد العون والسخاء و كل من تفضل علي ولو بكلمة طيبة جزاهم الله عني خير الجزاء وآخر دعوانا أن الحمد لله رب العالمين .

أزهار ذهب الموسوي

2006

الاهداء

الى من الهماني العزم وزرعا في نفسي الامل والدي ووالدي

اقرارا بجميل فضلهما

الى من ترك فراغا في نفوسنا , قرّة اعيننا اخي حيدر..... وكل الدماء التي
سقطت وتسقط غدرا.....

فخرا وتقديرا

الى اشقائي وشقيقاتي وكل القلوب التي توجهت بالدعاء
لي.....

حبا واعتزاز

الى كل العقول النيرة والاقلام النابضة بالحياة.....

أزهار ذهب الموسوي

الخلاصة

يعد خمج السحايا من المواضيع المهمة والمثيرة للانتباه إذ تعطي بعض الحالات المرضية نتيجة زرع سالب على الرغم من وجود الأعراض السريرية والاستجابة الالتهابية، وقد يعود السبب إلى بكتريا فاقدة الجدار وربما للعلاج المسبق بالمضادات الحيوية. لذا تم اختيار هذه الدراسة للتعرف إلى فاقدات الجدار من البكتريا ودراسة بعض أوجه الأمراض فيها والمسببات ذات الجدار المشتركة مع خمج السحايا. تم تشخيص 50 حالة خمج سحايا من مجموع 93 حالة مثيرة للشك سحب منها السائل المخي الشوكي (CSF) استناداً للاستجابة الخلوية غير المتخصصة التي تقوم بها الخلايا البلعمية (فحص الشريحة) لأطفال تتراوح أعمارهم من شهر 5- سنوات في مستشفى بابل للولادة والأطفال للفترة من 1-5- 2004 إلى 1-5-2005.

تم تشخيص البكتريا المسببة للمرض عن طريق زرع عينة السائل المخي الشوكي بالطرق التقليدية وبطرق التحري عن فاقدات الجدار ووجد أن البكتريا فاقدة الجدار شكلت نسبة 12% ولوحظ وجودها أما داخل الخلية الالتهابية أو على سطحها وذات الجدار شكلت نسبة 22% وكان لبكتريا (*Haemophilus influenzae b (Hib)* النصيب الأكبر بنسبة 4% لذات الجدار و4% لفاقدات الجدار تلتها بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسبة 2% لذات الجدار و4% لفاقدات الجدار و4% لفاقدات الجدار و *Streptococcus pneumoniae* و *Streptococcus agalactiae* بنسبة 6% لذات الجدار ثم *Klebsiella pneumoniae* بنسبة 2% لذات الجدار و *Listeria monocytogenes* بنسبة 2% لفاقدات الجدار كما أن للخمائر دور في الإصابة بنسبة 2% لذات الجدار و2% لفاقدات الجدار.

درست الاستجابة المناعية الخلوية غير المتخصصة المرافقة للمرض ووجد زيادة الخلايا العدلة.

تم اختيار البكتريا الأكثر تواجداً في حدوث المرض *H. influenzae b* ودراسة امراض ذات الجدار وفاقدة الجدار من هذه البكتريا في الفار الابيض حيث لوحظ تشابه الأعراض والامراضية لكلا النوعين وفي الإنسان.

جرى التحري عن الضد المتخصص بالبكتريا المسببة للمرض ورسم الملامح المناعية لكل حالة والتأكيد في التحري عن بكتريا *H. influenzae b* وتحضير مستضد المحفظة والغلاف البروتيني الخارجي والتحري عن الضد الموضعي والجهازية المتخصص ببكتريا *H. influenzae b* ودرست المستضدية الموضعية والجهازية بعد تغطية مصلى الأرنب المتخصص بمستضد المحفظة على كريات دم الخروف المدبوغة،

II

وجد أن هناك مجموعة من المرضى أعطت نتيجة فحص بكتريولوجي سالب بينما أعطت نتيجة فحص مناعي (ضدية أو مستضدية) موجب.

كما تم التعرف على الاستجابة المناعية الموضعية والجهازية من خلال قياس تركيز البروتين الموضعي والجهازية إذ لوحظ زيادة تركيز البروتين الموضعي في الحالات المرضية وعدم اعتماد البروتين الكلي مؤشراً للمرض.

ووجد أن هناك زيادة ملحوظة في تركيز الكلوبولين المناعي 1gM ، 1gA ، 1gG وتركيز المتمم C₃ و C₄ في فحص الانتشار المناعي القطري (RID).

لم تحفز مستضدات بكتريا *H. influenzae b* استجابة خلوية متمثلةً باختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض غير المعنوي واختبار الجلد في الأرنب وأظهرت الطرق التشخيصية زرعية ومناعية معنوية واضحة باستخدام اختبار Z للفرق بين نسبتين وتباينت الطرق بمعنويتها باحتمالية $P \leq 0.05$ في المرضى من البشر.

المحتويات

الصفحة	الموضوع
I	الخلاصة
III	المحتويات
X	قائمة الجداول
XI	قائمة الأشكال
1	الفصل الأول : المقدمة
1	1-1 الأهمية
2	2-1 مبررات الاختيار
2	3-1 الأهداف
3	الفصل الثاني : استعراض المراجع
3	1-2 نظرة تركيبية ووظيفية للجهاز العصبي
4	2-2 أمراض الجهاز العصبي
5	3-2 أمراض الجهاز العصبي البكتيرية
5	A - خراج الدماغ
5	B- خمج السحايا
6	4-2 المسببات المشاركة مع خمج السحايا البشري
6	A- ذات الجدار
7	B- فاقدة الجدار
9	5-2 بكتريا <i>H. influenzae b</i> بوصفها مسبب مشارك مع خمج السحايا
11	6-2 آلية حدوث خمج السحايا البشري
11	A- ذات الجدار
13	B- فاقدة الجدار
13	7-2 أمراض <i>H. influenzae b</i> في حيوان المختبر
14	8-2 مناعة خمج السحايا في البشر
16	9-2 مناعة <i>H. influenzae b</i> في حيوان المختبر
17	10-2 طرائق التشخيص لخمج السحايا البشري
18	A- طرائق التشخيص البكتيري
18	B- طرائق التشخيص المناعي
19	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل
19	1-3 المحاليل والصبغات والكواشف البكتريولوجية
19	1-1-3 المحاليل
19	1- محلول الملح الطبيعي
19	2-1-3 الصبغات
19	1- صبغة كرام
19	2- صبغة دينيز
19	3- صبغة ليشمان
19	3-1-3 الكواشف
20	2-3 المحاليل المناعية
20	1- المحلول الملحي الفورمالييني
20	2- محلول بنزال كونيوم كلورايد

الصفحة	الموضوع
20	3- محلول منظم ترس
20	4- محلول ثاني مركبتو ايثانول
21	5- محلول ازايڊ الصوديوم
21	6- محلول البايوريت
21	7- محلول الالبومين وتخافيفه القياسية
22	8- محلول السيفر
22	9- محلول حامض التانيك
22	10- محلول استيت الصوديوم الاثيلي
22	3-3 الاوساط الزرعية
22	A- الاوساط البكتيرية
24	B- الأوساط مناعية
24	- وسط اكار A
24	- محلول الايكل الاساسي
25	4-3 مواد مصنعة نبيذة
25	3-5 الاجهزة
26	3-6 العينات
26	A-المرضى بالسحايا
26	B-السيطرة
27	3-7 منوال الدراسة
29	3-8 جمع العينات
29	1- سائل النخاع الشوكي
29	2- دم بدون مانع تجلط
29	3- معاملة العينات
29	1- الصفات المظهرية والقوام
29	2- حساب عدد الخلايا البيض في السائل المخي الشوكي
30	3- قياس تركيز البروتين الكلي في عينة السائل المخي الشوكي
31	4- قياس تركيز السكر في عينة السائل المخي الشوكي
32	3-9 طرق الزرع الاعتيادية
32	3-10 طرق زرع فاقدة الجدار
34	3-11 طرق التعرف الاعتيادية
34	- الشكل الخارجي
34	- الخصائص المزرعية
35	- الحاجة الى عاملي x و v
35	- تحديد النوع المصلي لـ <i>H. influenzae b</i>
37	3-12 موديل الفار الأبيض لخمج السحايا
37	1- حث فقد الجدار البكتيري باستعمال البنسلين
37	2- العدوى التجريبية
38	3-13 الدراسة المناعية على المرضى
38	1- تحضير المستضدات الجرثومية
38	A- تحضير المستضد السطحي للبكتريا سالبة الكرام المقتول حراريا

الصفحة	الموضوع
39	B- تحضير المستضد السطحي للبكتريا موجبة الكرام المقتول بالبنزال كونيوم كلورايد
39	C- تحضير مستضد بروتينات الجدار الخارجي لبكتريا <i>H.influenzae b</i>
40	D- تحضير راشح خلاصة المزروع الحر من الخلايا بالترشيح الفوقي بالاغشية المرشحة الدقيقة
40	E- تحضير مستضد المحفظة
42	2- الاختبارات المصلية
42	A- طرائق الفصل
42	1- فصل الامصال
42	2- فصل الكلوبوليونات المناعية الافرازية في عينة السائل المخي الشوكي
42	B- اختبار التلازن بالانابيب
43	1- اختبار التلازن بالانابيب في المصل
44	2- اختبار التلازن بالانابيب للكلوبوليونات المناعية الافرازية
44	3- اختبار اختزال الاضداد الافرازية والجهازية
45	4- قياس تركيز الكلوبوليونات الافرازية في مستخلص السائل المخي الشوكي وتركيز البروتين الكلي في المصل
46	5- دراسة المنحني القياسي لتركيز البروتين
48	6- اختبار التلازن الدموي غير المباشر
49	7- الانتشار المناعي القطري RID
50	8- التلازن الدموي غير المباشر العكسي
51	3-14 الدراسة المناعية في الارنب لمستضدات <i>H.influenzae b</i>
51	1- الحيوان المختبري
51	2- تحضير المستضدات
51	3- المساعدات المناعية
51	4- برنامج التمنيع
53	5- الاختبارات المناعية
53	A- استخلاص البروتين الافرازي من الزائدة الدودية والاثنى عشر
53	B- قياس تركيز البروتين الكلي والافرازي
53	C- اختبار التلازن بالانابيب
54	D- فصل الخلايا البيضاء من الزائدة الدودية والاثنى عشر
54	E- اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض LIF
55	F- اختبار الجلد
56	3-15 التحليل الاحصائي
57	الفصل الرابع: النتائج
57	4-1 الصفات الفيزيائية والكيميائية للسائل المخي الشوكي
58	4-2 الفحص البكتريولوجي للسائل المخي الشوكي والاختبارات المعززة الأخرى
58	4-2-1 الفحص المباشر – فحص السائل المخي الشوكي
58	4-2-2 الوصف المزرعي – وصف النمو على طبق الزرع الاولي
58	A- ذات الجدار
58	B- فاقدة الجدار
58	C- تموضع فاقدة الجدار في مرضى السحايا

الصفحة	الموضوع
60	3-2-4 الوصف المجهرى للمسبب المشارك النامي في المزرعة الثانوية
60	A- ذات الجدار
60	B-فاقدة الجدار
60	4-2-4 الوصف المزرعي للمسبب المشارك النامي في المزرعة الثانوية
60	A- ذات الجدار
61	B-فاقدة الجدار
61	5-2-4 التعرف الكيمياوي الحيوي للمسبب المشارك في المزرعة النقية
61	A- ذات الجدار
61	B-فاقدة الجدار
62	6-2-4 وصف المسببات المشاركة
62	<i>Haemophilus influenzae b</i> -1
62	<i>Staphylococcus aureus</i> -2
63	<i>Streptococcus pneumoniae</i> -3
63	<i>Streptococcus agalactiae</i> -4
63	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -5
64	<i>Listeria monocytogenes</i> -6
64	7- الخمائر Yeast
65	7-2-4 تنوع المسببات المشاركة مع خمج السحايا
65	A-ذات الجدار
65	B- فاقدة الجدار
66	8-2-4 اختيار المسبب المشارك ذو السيادة الامراضية في المناعة
66	9-2-4 امراض البكتريا الاكثر تواترا في خمج السحايا في الفار الابيض بالحقن عبر القحف
72	10-2-4 الجدوى العملية للطرق الزرعية المختلفة في تشخيص السحايا في الانسان
73	3-4 دراسة بعض الجوانب المناعية لمرضى السحايا
73	1-3-4 الاستجابة الخلوية غير المتخصصة لمرضى السحايا
75	2-3-4 الضد المتخصص في سائل النخاع الشوكي للمرضى المصابين بخمج السحايا
78	3-3-4 الضد المتخصص بـ <i>H. influenzae b</i> في مرضى السحايا
79	4-3-4 الضد الموضعي والجهازى المتخصص بـ <i>H. influenzae b</i> في مرضى السحايا
80	5-3-4 تركيز البروتين الكلي والموضعي لمرضى <i>H. influenzae b</i>
82	6-3-4 تركيز الكلوبولين المناعي المختلفة في المصل لمرضى السحايا
82	7-3-4 تركيز اجزاء المتمم C3 و C4 في المصل لمرضى السحايا
85	8-3-4 المستضدية الموضعية والجهازية المتخصصة بيكتريا <i>H. influenzae b</i> في مرضى السحايا
86	9-3-4 الجدوى العملية للطرق المناعية في تشخيص السحايا في الانسان
87	10-3-4 جدوى الطرق المختلفة في تشخيص خمج السحايا البشري باستخدام احصاء Z للفرق بين نسبتين
89	4-4 الدراسة المناعية لـ <i>H. influenzae b</i> في الأرنب
89	1-4-4 المناعة الموضعية والجهازية في الارنب الممنع بمستضد البروتين الغشائي الخارجي لبكتريا <i>H. influenzae b</i>

الصفحة	الموضوع
91	2-4-4-4 المناعة الموضعية والجهازية في الأرنب الممنع بمستضد المحفظة لبكتريا <i>H.influenzae b</i>
93	الفصل الخامس: المناقشة
93	1-5 الصفات الفيزيائية والكيميائية للسائل المخي الشوكي لمرضى السحايا
93	A- الوصف الفيزيائي
93	B- الوصف الكيميائي
94	2-5 الفحص البكتريولوجي للسائل المخي الشوكي والاختبارات المعززة الأخرى
94	1-2-5 الفحص المباشر
94	2-2-5 وصف النمو على طبق الزرع الأولي
95	3-2-5 وصف المسببات المشاركة
95	4-2-5 تنوع المسببات المشاركة مع خمج السحايا
97	5-2-5 موديل تجريبي لدراسة امراضية <i>H.influenzae b</i> في الفار الأبيض بالحقن عبر القحف
98	3-5 دراسة بعض الجوانب المناعية لمرضى السحايا
98	1-3-5 الاستجابة الخلوية غير متخصصة لمرضى السحايا
99	2-3-5 الضد المتخصص بالمسببات المشاركة مع خمج السحايا في المرضى وال ضد المتخصص بـ <i>H.influenzae b</i>
100	3-3-5 الضد الموضعي والجهازية المتخصص بـ <i>H.influenzae b</i> في مرضى السحايا
102	4-3-5 تركيز البروتين الكلي والموضعي لمرضى <i>H.influenzae b</i>
102	5-3-5 اصناف الكلوبولين والمتمم في مرضى السحايا
103	6-3-5 المستضدية الموضعية والجهازية المتخصصة بـ <i>H.influenzae b</i> في مرضى السحايا
104	7-3-5 جدوى الطرق العملية في تشخيص السحايا في الانسان
105	4-5 الدراسة المناعية لـ <i>H.influenzae b</i> في الأرنب
105	1-4-5 المناعة الموضعية والجهازية للأرنب الممنع بمستضد المحفظة والبروتين الغشائي الخارجي لبكتريا <i>H.influenzae b</i>
106	الاستنتاجات
107	التوصيات
108	المصادر
	الخلاصة باللغة الإنكليزية

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
36	الفحوص البايوكيميائية التأكيدية للعزلات البكتيرية ذات الجدار وفاقدة الجدار	1
48	البيانات والمعالم الاحصائية لمعادلة المنحني القياسي لتراكيز محلول الألبومين وتخفيفه القياسية	2
52	طريقة التمنيع في الحيوان المختبري	3
57	الوصف الفيزيائي والكيميائي للسائل المخي الشوكي	4
65	المسببات المشاركة مع خمج السحايا في المرضى	5
67	نتائج تجربة الامراضية لبكتريا <i>H.influenzae b</i> في حيوان الفار الابيض	6

VIII

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
7	امراض البكتريا الاكثر تواترا في خمج السحايا في الفار الابيض	71
8	الجدوى العملية للطرق الزرعية المختلفة في تشخيص السحايا في الانسان	72
9	التعداد الكلي لكريات الدم البيضاء في مرضى السحايا	74
10	الاستجابة الخلوية غير متخصصة لمرضى السحايا	74
11	الاستجابة الخلوية غير متخصصة من الخلايا البيض المرافقة لخمج السحايا عند فحص السائل المخي الشوكي طبقا لنوع المسبب المشارك	75
12	الضد المتخصص بالمسببات المشاركة مع خمج السحايا في المرضى	77
13	الضد المتخصص بـ <i>H.influenzae b</i> في مرضى السحايا	79
14	الضد الموضعي والجهازية في السائل المخي الشوكي مع مستضد المحفظة المحضر من <i>H.influenzae b</i> لمرضى السحايا	80
15	تركيز اصناف الكلوبولين المناعي المختلفة في مرضى السحايا	83
16	تركيز اجزاء المتمم C3 و C4 في مرضى السحايا	84
17	المستضدية الموضعية والجهازية المتخصصة ببكتريا <i>H.influenzae b</i> في مرضى السحايا	86
18	الجدوى العملية للطرق المناعية في تشخيص السحايا في الانسان	87
19	جدوى الطرق المختلفة في تشخيص السحايا في الانسان	88
20	المناعة الموضعية والجهازية للارنب الممنع بمستضد البروتين الغشائي الخارجي لبكتريا <i>H.influenzae b</i>	90
21	المناعة الموضعية والجهازية للارنب الممنع بمستضد المحفظة لبكتريا <i>H.influenzae b</i>	92

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	الخطوات المتبعة مع عينة السائل المخي الشوكي	33
2	المنحنى القياسي لتراكيز محاليل الالبومين القياسي والكثافة الضوئية	47
3	تموضع البكتريا فاقدة الجدار في عينة السائل المخي الشوكي	59
4	مسحة مصبوغة لبكتريا <i>H.influenzae b</i>	68
A	سائل الدماغ	68
B	مزرعة نقية	68
5	علامات خمج السحايا في الحيوان المختبري (الفار الابيض)	96
6	مقاطع نسيجية في دماغ الفار الابيض	70
7	تركيز البروتين الكلي عم/ لتر لمرضى <i>H.influenzae b</i>	81
8	تركيز الكلوبولين الموضعي عم/ لتر لمرضى <i>H.influenzae b</i>	81

Chapter One الفصل الأول

Introduction المقدمة

1-1: الأهمية

على الرغم من التطور الحاصل في الأجيال الجديدة والمتعددة في المضادات الحيوية في مجال التطبيق الفعلي للاستخدام السريري والتقدم في التشخيص واستعمال تقنيات متطورة يبقى لبعض الأمراض انتشارا ظاهرا ومن هذه الأمراض خمج السحايا القيحي بوصفه سببا رئيسا للوفاة في عدد كبير من دول العالم من ضمنها العراق (Shnawa and Al-Amedi,1998 ;Tunkel and Michel,1997; Azubuiké,1990). يصيب هذا المرض الأطفال والبالغين على السواء و تتمثل معظم الإصابات للشفاء التام أو قد يسبب الخمج تلفا حادا ينتهي بالوفاة وربما يؤدي إلى الشلل والصمم وضعف العضلات والتخلف العقلي والصحي ويعد الإنسان الضعيف مناعيا أكثر تعرضا للخمج (Paul et al.,2003;Flier et al., 2003 ; Shapera and Leib,2003) . يتسبب الخمج بعدد واسع من الميكروبات وباتماد نوع المسبب قسم إلى خمج سحايا قيحي Septic or Purulent meningitis وخمج سحايا غير قيحي Aseptic or Non purulent meningitis . يحدث الخمج القيحي بوساطة بكتريا مختلفة ويحدث بوصفه مرضا أوليا أو ثانويا نتيجة حدوث خلل أو مرض في بعض أجزاء الجسم الأخرى, وقد يكون حادا Acute حيث تستمر الأعراض من ساعات إلى عدة أيام أو مزمننا Chronic تستمر الأعراض فيه أسابيع إلى أشهر) Spach and (Jakson,1999) . يتميز بعكورة سائل النخاع الشوكي (CSF) واحتوائه على أكثر من 500 خلية / ملم³ من خلايا الدم البيض التي تتميز بسيادة الخلايا العدلة Neutrophil (Flier et al.,2003; Mastroianni et al., 1998). أما النوع الثاني فإنه يظهر استجابة خلوية غير قيحية من أحاديات النواة أو الخلايا للمفاوية وهذا سببه الفيروسات أكثر من الميكروبات الأخرى حيث تكون الإصابات غير واضحة بعد الإصابة الأولية وتكون نسبة الخلايا للمفاوية سائدة في سائل النخاع الشوكي إذ يتراوح العدد من 10-500 خلية/ملم³ (Nelsen et al., 1993). كما انه قد يتسبب المرض بمجاميع أخرى من الاحياء المجهرية منها الفطريات Fungi والابتدائيات Protozoa والخمائر Yeast (Pahari,2004) .

2-1: مبررات الاختيار

نظرا لأهمية خمج السحايا وخطورته وخاصة في الأطفال وزيادة نسبة الحالات التي تظهر العلامات السريرية والسايولوجية مع فحص بكتريولوجي سالب , هذا الوضع أشار لاحتمال كون المسبب من فاقدات الجدار المتخفية في سائل النخاع الشوكي (CSF) أو في محتواه الخلوي مما أدى إلى التفكير في دراسة هذا الموضوع .

3-1: الأهداف

1. دراسة مدى تواجد فاقدات الجدار وذات الجدار في حالات السحايا البشرية السالبة بالزرع الروتيني وتحديد المسببات الأكثر شيوعا منها ثم فحص امراضيتها في الفار الأبيض.
2. دراسة المناعة الخلطية الموضعية والجهازية لمرضى السحايا المتسبب عن فاقدات الجدار وذات الجدار بضمنها المسبب الأكثر شيوعا.
3. دراسة المناعة الخلطية والخلوية في الأرنب لمستضدات المسبب الأكثر شيوعا.

Chapter two الفصل الثاني Literature Review استعراض المراجع

1-2: نظرة تركيبية ووظيفية للجهاز العصبي

يتكون الجهاز العصبي المركزي من المخ والمخيخ والنخاع المستطيل ويمتد منهما الحبل الشوكي ومنه الاعصاب المحيطية، وتعد أمراض الجهاز العصبي قليلة لكنها مهددة للحياة حيث يقدم الجهاز العصبي بيئة خاصة لأمراض البكتريا والفطريات و الفيروسات والطفيليات. ويكون الدماغ والنخاع الشوكي محميين بوساطة العظام والاعغلة المحيطة ويكون مقسم بحواجز عن جهاز الدوران . ويفتقد الجهاز العصبي إلى جهاز مناعي حقيقي وجوهري Intrinsic ويمتلك وحدة تركيبية واحدة يكون فيها الدماغ محمي بوساطة عظام الجمجمة والاعغلة الخارجية السحائية المحيطة به (Pia Matter, Arachnoid, Dura Matter) وترتبط الام الجافية Dura بقوة بالعظام (Gray and Fedorko, 1992).

تنشأ اصابات المنطقة فوق الجافية Epidural Infection عادة من اصابات العظم Osteomyelitis وتبقى موضعية في منطقة الثقب الكبير و تصبح الجافية حرة مكونة فراغا حقيقيا تحت الأم الجافية يحيط بالحبل الشوكي Spinal Cord وتكون الجافية والغشاء العنكبوتي Arachnoid في الدماغ غير مرتبطين ببعضهما ببعض (Zhang and Tuomanen, 1999).

عندما يخترق الميكروب الجافية الى داخل فراغ الجافية Subdural Space سوف تنتشر الاصابة بسرعة في كل بيئة المخ Cerebral اما الفراغ تحت العنكبوتي Subarachnoid Space فهو فراغ حقيقي يحتوي سائل النخاع الشوكي الذي يجري من تجويف الدماغ Ventricle الى الوعاء القاعدي Basilar Cisterna. يحتوي سائل النخاع الشوكي قليلا من الأضداد Antibodies أو المتمم Complement وقليلًا من الخلايا البلعمية ولذلك فحال دخول الميكروب الفراغ يخضع لمرحلة النمو الاولي للطور اللوغاريتمي ليعد نفسه لعلامات خمج السحايا الميكروبي (البكتيري) الحاد او يخضع لمرحلة من الطور اللوغاريتمي (Granert et al., 2000; Anderson et al., 2000).

يحجز الجهاز العصبي عن جهاز الدوران بوساطة حاجز الدماغ – الدم Blood Brain Barrier (BBB) الذي يتكون من تركيبين ومترابطين هما الحاجز بين الدم والدماغ في الاوعية الشعرية الدماغية Cerebral Capillaries والحاجز بين الدم وسائل النخاع الشوكي في الضفيرة المشيمية Choroid Plexus مما يعني فصل الدماغ والنخاع الشوكي عن المكونات داخل وعائية. يمنع هذا الحاجز في الاصحاء كل الميكروبات والاصباغ والجزيئات الكبيرة والاضداد Ab وغيرها من دخول الدماغ ويعمل

منظما داخليا ومكافئا فسيولوجيا للطبقة الدهنية المستمرة ويحافظ على التوازن داخل سائل النخاع الشوكي (Zhang and Tuomanen, 1999) .

2-2: امراض الجهاز العصبي

ان تشريح الدماغ والاعشية السحائية Meninges يحددان الصفات الخاصة بخمجات الجهاز العصبي اذ يبقى خراج فوق الجافية Epidural Abscess موضعي في حين ينتشر خراج تحت الجافية Subdural Abscess للمحيط وتنتشر اصابات الفراغ تحت العنكبوتي بصورة واسعة في الدماغ والنخاع الشوكي في حين يمنع حاجز الدماغ - الدم الجزيئات الكبيرة من دخول النسيج الحشوي في الدماغ Brain Parenchyma ونتيجة ذلك تكون نسبة الاضداد والمتمم ضئيلة في دماغ الأصحاء باستثناء حالات الإصابة إذ ترتفع فيها هذه النسب. ويكون الفراغ بين الخلايا في النسيج الحشوي للدماغ صغيرا جدا للسماح بمرور الفيروسات على الرغم من امكانية مرور بعضها فضلا عن امكانية مرور بعض السموم البكتيرية مثل سموم الكزاز للجهاز العصبي بطريقة معينة) (Zhang and Tuomanen, 1999 Gray and Fedorko, 1992).

تحدث إصابة الجهاز العصبي بمجموعة من الاحياء المجهرية ويتحدد ذلك بعدد من العوامل منها العمر, والحالة المناعية للفرد, ووبائية الكائن الممرض. وعلى العموم تعد الاصابات الفايروسية اوسع انتشارا من الاصابات البكتيرية وهذه اوسع انتشارا من الاصابات الفطرية والطفيلية, وكذلك تتشابه أعراض وعلامات أمراض الجهاز العصبي بصورة عامة ويعتمد التعرف عليها من خلال التشخيص الدقيق للميكروب (Granert et al., 2000; Ring et al., 1999).

2-3: امراض الجهاز العصبي البكتيري

A: خراج الدماغ Brain Abscess

يعرف خراج الدماغ بانه تغير مرضي قيحي موضعي يصيب النسيج الحشوي للدماغ, ويتسبب عادة عن اكثر من نوع من انواع البكتريا الهوائية واللاهوائية اذ غالبا ما يعزل اكثر من مسبب واحد في الإصابة. تبدأ الإصابة بتكاثر البكتريا في موضع النخر المتسبب عادة عن طريق اختراق الميكروب للدماغ ((Gray and Fedorko, 1992) تسببه أنواع بكتيرية تشمل viridans streptococci المحللة للدم جزئيا نوع الفا وغير المحللة للدم S. mitis, S. anginosus والمكورات العنقودية Staphylococcus aureus وبعض العصويات السالبة الكرام و S. pneumoniae و Nocardia و asteroids فضلا عن مجموعة البكتريا اللاهوائية Peptostreptococcus, Bacteroides, Fusobacterium, Actinomyces و اقل شيوعا Eubacterium وبعض الفطريات (Kim Gray and Fedorko, 1992 ; Spach and Jakson, 1999 ; et al. ; 2005).

B: خمج السحايا Meningitis

مرض يصيب الأغشية المحيطة بالدماغ والحبل الشوكي والتي تعرف باسم السحايا Meninges كما يصيب السائل الدماغي الشوكي (CSF) Cerebral Spinal Fluid الذي يحيط بالمنطقة. يتسبب عن انواع عديدة من الاحياء المجهرية ويتميز المرض بعلامات واعراض متعددة تشمل الحمى, والصداع, والتقيؤ, وفقدان الوعي, وتصلب الرقبة والظهر فضلا عن التشنجات العصبية وانتفاخ اليافوخ في الاطفال حديثي الولادة, والإسهال, وقلة التغذية, ومضاعفات تنفسية (Mehta et al., 1999). يؤدي التأخر في العلاج الى بعض المضاعفات منها فقدان السمع, واضطراب الرؤية, وفقدان البصر, واختلاجات عصبية, واضطراب الحركة, والكلام, والتخلف العقلي (Gaudelus, 1994). كما تعد علامات واعراض السحايا غير متخصصة في المراحل المبكرة ويساهم التشخيص المبكر والعلاج في منع حدوث مضاعفات المرض او الوفاة كما تعد بعض العلامات السريرية مثل الحمى وتصلب الرقبة مفتاح التشخيص المبكر (Fowler et al., 2004).

2-4: المسببات المشاركة مع خمج السحايا البشري

A: ذات الجدار

يتسبب خمج السحايا البشري عن انواع من البكتريا الحقيقية ذات الجدار صنفت فيها البكتريا بحسب العمر إلى مجاميع فكانت الانواع البكتيرية الشائعة في الاعمار 0-4 اسبوع تشمل *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus*, *S. pneumoniae* وفي الأعمار 4-12 اسبوع *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* وفي الأعمار 3 أشهر إلى سنة تكون الاصابات بالانواع *N. meningitidis*, *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae b* وفي الأعمار أكبر من 50 سنة فتشمل الانواع البكتيرية الكرام هوائية (Schuchat et al., 1997; Tunkle and Michel, 1997; Douglas et al., 2004)

إن معدل الإصابة في دول العالم المتقدم منخفض مقارنة بالدول النامية فقد انخفضت نسبة الإصابة في السنوات الاخيرة نتيجة استخدام اللقاحات وخاصة ببكتريا *H. influenzae b* (Peltola, 2000; Ocakton et al., 2004). إذ اشار الباحثون الى انخفاض الإصابة في الولايات المتحدة بنسبة 50% للفترة من 1986-1995 وبصورة خاصة في الاطفال بالاعمار 2 شهر الى 5 سنوات (Schuchat et al., 1997). وفي كندا تقدر الاصابات بـ 1000 حالة سنويا وقد انخفضت بعد استخدام اللقاح بشكل كبير (Pediatrics and Child Health, 2001) كذلك انخفضت الاصابات في بريطانيا وخاصة في الاطفال بعمر اقل من 5 سنوات حتى وصلت النسبة 40% (Mehta et al., 1999; Greenwood, 1988). ويلاحظ أن بعض الإصابات من

النوع المتوطن Endemic حيث يتعرض الناس للاصابة بهذا المرض على مدار السنة ويصيب أعدادا كبيرة من السكان وقد يظهر على شكل اوبئة دورية Periodic او قد يظهر في اوقات مختلفة في المناطق الاخرى (Djibo *et al* ;Hansman,1983) (Nicolas *et al.* 2005 ; 2003)

B: فاقدة الجدار Stealth Pathogen or Cell Wall Deficient Bacteria (CWDB)

فاقدات الجدار هو مصطلح يشير الى بكتريا تمتلك غشاء خلويا مختلفا في الشكل والتركيب,والصلابة أو الطبقات وهذه الخصائص تمكن مثل هذه البكتريا من سهولة حركة الحامض النووي DNA بين الخلايا وبين مجاميع البكتريا الفاقدة الجدار لتلتحم سوية وتسهل من التجارب الوراثية.وفي الحقيقة إن أشكال الخلية تنتج بوساطة إضعاف,اوعدم استمرارية, أو غياب الجدار الخلوي (Mattman,1993).

تطلق مصطلحات كثيرة على مثل هذه البكتريا منها Sphearoplast ,L- Phase ,Transitional ,Protoplast التي لاتستطيع تكوين أي جدار خلوي وهي كثيرة التنوع في الشكل وربما تلعب دورا في ظهور مرض السرطان (Robinson ,2004; Brown *et al.*,2003). إن التغير في شكل ووظيفة معظم الميكروبات ربما يشرح اصل معظم امراض نقص المناعة الذاتي مثل خمج المفاصل الروماتيزمي Rheumatoid Arthritis , التسمم الدموي Septicemia ,خمج السحايا, خمج المجاري البولية, خمج صمام القلب Heart Valve Infection وخمج العيون. إذ أن هذه الكائنات سرية Claudestin في الاغلب غير متميزة كلية الوجود Omnipresent (Douglas ,2004; Mattman,1993; Calderon *et al.*;1971).

إن النظريات الحديثة تتجه حول ازالة الغموض الذي يحيط معظم امراض نقص المناعة وتحملها على مسببات بكتيرية تستطيع تغيير جدارها وفعاليتها وتصبح مايسمى CWDB. هذه الميكروبات يمكن رؤيتها في المجهر المعتم الحقل في عينات الدم الحية لمرض خمج المفاصل الروماتيزمي وتصلب الشرايين المتعدد Sarcoidosis (Robinson,2004 ; Cantwell,2003 ; Brown *et al.*,2003).

تعد البكتريا فاقدة الجدار ذات دور في العديد من الاصابات التي تحدث في الانسان وبالاخص المتكررة منها او المزمنة Recurrent or Chronic ومن هذه الامراض خمج السحايا المزمن (Calderon *et al.*,1971) وقد وجد ان نسبة حدوث الاصابات الراجعة في الاطفال غير اعتيادي ومرتبطة بعدة عوامل منها الخلل في الجهاز المناعي ونقص المناعة المكتسبة او الخلل في النخاع الشوكي او العمود الفقري. ففي استطلاع بحثي بين 1978-1988 وجد ان 47 حالة راجعة وذكر ان 47% من الحالات كانت باعمار اقل من عمر 18 سنة لاشخاص تعرضوا لحوادث تحطم الجهاز العصبي نتيجة

لعملية او مرض او لديهم خلل في الجهاز المناعي او وجود ناسور ولادي في سائل النخاع الشوكي Congenital CSF Fistula (Lassiter et al.,1992 ; Pahari,2004) . وتستطيع هذه البكتيريا احداث اصابات مزمنة لقدرتها على التخفي في مواقع محمية من الجسم كما تمتاز الاصابات التي تحدثها بكونها ساكنة وتحفز بوساطة التغيرات المناعية والكيموحيوية في المضيف (Domingue, 1980) . يعتمد بقاء الكائن الحي المجهرى في المضيف على المناعة العفوية او الحالة المناعية الذي يمتلكها فقد يتغلب المضيف على الكائن المجهرى ويتخلص او يشفى منه او قد يحصل العكس ويهرب من فعل المناعة العفوية او التكيفية ويتغلب عليها ويصبح متخفيا بعيدا عن تاثير الاجسام المضادة وبذلك يصبح المرض مستديما او يمتلك قدرة التخفي والرجوع لحدوث الاصابة عند ضعف المناعة في الجسم (Walter et al., 1996) .

2-5: بكتريا *H. influenzae b* (Hib) بوصفها مسبب مشارك مع خمج السحايا

عصيات سالبة الكرام تظهر تعددا ظاهرا في الشكل فقد تبدو بشكل عصيات مكورة Coccobacilli وأحيانا تظهر بأشكال خيطية طويلة غير متحركة وغير مكونة للسبورات, لا تنمو في اوساط الزرع الاعتيادية اذ تحتاج الى عوامل نمو خاصة متواجدة في الدم هما Heme (x) و NAD(v) (Musher et al.,1986); (Meissneir and Lary, 2002). تضم سبع أنماط مصلية Serotype باعتماد مستضدات متعددة السكريات للمحفظة a-f وبضمنها e- وواحد وعشرين تحت نمطا مصليا Subserotype على أساس بروتين الغشاء الخارجي Outer Membrane Protein (OMP) (Musher et al., 1986; Robert et al.,1981) .

تعد هذه البكتريا بنوعها المحفظ وغير المحفظ جزءا من الفلورا الطبيعية للبلعوم الانفي Nasopharynx والحلق Throat وعلى الرغم من هذا فهي تسبب عددا من الامراض الغازية والموضعية لكونها تلعب دورا انتهازيا Opportunistic ولذلك تعد اكثر المسببات المرضية عند الاطفال (Meissneir and Lary 2002). وتعتبر هذه البكتريا اكثر شيوعا في اصابات الاطفال بعمر اقل من 5 سنوات وتشكل نسبة 80-90% في الاطفال بعمر شهر -3 سنوات ويعد النمط b المسبب الرئيسي لخمج السحايا البكتيري. لكن الإصابة بها انخفضت إلى مستوى أدنى نتيجة استخدام اللقاحات; CDC,1998; (Ocakton et al.,2004 Landgraf and Vieira,1993)

إن امراضية البكتريا غير واضحة وتعد المحفظة (الكبسولة) اهم عوامل الضراوة فيها حيث تخترق البكتريا المحفظة الطبقة الطلائية للمجرى الانفي وتغزو الاوعية الدموية وتساعد المحفظة في تجنب عملية البلعمة والتحلل بنظام المتمم (Brown et al.,1982) . تتكون المحفظة من Polyribitol Phosphate (PRP) المقاوم للبلعمة ونظام المتمم ويحفز انتاج الاضداد ضد المحفظة (Clemens,2003) .

إن تركيب المحفظة عبارة عن بوليمر خيطي يتكون من الرايبوز والرايبيتول (كحول سكري خماسي الكربون) وفوسفيت ويعد النمط b الوحيد الذي يحوي سكر خماسي رايبوزي بدلا من سكر سداسي بوصفه مكونا كربوهيدراتيا أساسيا للمحفظة, ويعد متعدد السكريد المحفطي للنمط b الحامي الاساسي للبكتريا من اليات الدفاع في المضيف (Hougs *et al.*,1999;Kimura and Hansen,1986). كما يحدث النمط b امراضا اخرى منها خمج المزمار Epiglottitis, خمج الجيوب الانفية Sinusitis, خمج البلعوم الانفي Nasopharyngeal, خمج المفاصل Arthritis, خمج الأذن الوسطى Otitis Media, تجرثم الدم Bacteremia و خمج النسيج الخلوي Cellulitis (CDC,1998;Vanalphen,*et al.*,1997; Marks, *et al.*,1982).

لا تنتج بكتريا *H. influenzae b* سموم خارجية لكنها تمتلك سموم داخلية تتواجد في جدار الخلية متمثلا ببروتينات الغلاف الخارجي OMP ومتعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharaide (LPS) (Puliyel,2001;Guldiero *et al.*,2001). إن بروتينات الغلاف الخارجي قد تكون مفيدة لإمكانية استخدامها جزء □ من اللقاحات ومن أكثرها استخداما البروتينات المعروفة P2 و P6 إذ يمثل P2 البروتين الخارجي الأساسي ويشكل أكثر من 50% من بروتينات الغلاف الخارجي فيما يشكل P6 (1-5)% من المحتوى البروتيني للغلاف الخارجي (Loeb and Smith,1982; Wispelwey *et al.*,1989). وتلعب مكونات متعدد السكريد الدهني LPS لبكتريا *H.influenzae b* دورا معنويا في تسببها للمرض إضافة إلى الخمل Fimbria و IgA Protease ، والبكتريوسين (Muhe and Klugman,1999) .

إن التصاق بكتريا *H. influenzae b* بالخلايا الطلائية للبلعوم الأنفي مرتبط بوجود تراكيب تشبه الشعر على سطح البكتريا تدعى الخمل Fimbria وهذه تتوسط عملية الالتصاق ولكي تغزو الغشاء أطلائي المخاطي للمضيف يجب ان تتجنب الكلوبوليئين المناعي الإفرازي IgA واليات التصفية الخلوية (Quagliarello and Scheld,1992 ; Vanalphen *et al.* 1997) .

بعد عملية الالتصاق وغزو الطبقة المخاطية تدخل البكتريا وتعيش في الفراغ داخل الاوعية وقد يكون دخول البكتريا الدم من القناة التنفسية من خلال الاوعية الدموية للمفاوية الى العقد الموضعية او من خلال الغزو المباشر خلال البطانة تحت المخاطية للأوعية الدموية (Quagliarello and Scheld ,1992; Cauwels *et al.*, 1999) .

2-6: آلية حدوث خمج السحايا البشري

A: ذات الجدار

هناك ثلاث طرق مهمة ينجح من خلالها الميكروب الوصول الى الجهاز العصبي سواء كان بكتريا , اوفايروس , اوفطر أو طفيلي .وفي البداية يستوطن الميكروب اويكون خمجا موضعيا في المضيف وهذا يمثل استعمارا Colonization أو إصابة للجلد,

والمجرى الأنفي ألبعومي ,والجهاز التنفسي ,والجهاز المعوي أو الجهاز التناسلي (Zhang and Tuomanen,1999;Tunkle and Scheld, 1993).

تستوطن معظم الميكروبات الجهاز التنفسي خاصة المجرى الانفي البعومي مثل بكتريا *H. influenzae b* و *S.pneumoniae*, *N.meningitidis* . من هذا المكان يخترق الميكروب الطبقة المخاطية باختراق الوسائل الدفاعية للمضيف مثل الحواجز الفيزيائية والمناعةالموضعيةوالخلايا البلعمية ويجد طريقه الى الجهاز العصبي بوساطة:

1. غزو مجرى الدم *Parasitism* , *Viremia*, *Bacteremia* و *Fungemia* وبهذا ينتشر الى الجهاز العصبي وتعد هذه اكثر الطرق شيوعا في الاصابة بمعظم الميكروبات مثل *Treponema* , *Cryptococcus*, *Streptococcus* , *Neisseria* .

2. عن طريق تردي الاعصاب السمعية والمحيطية مثل الاصابات الطفيلية .
3. الانتقال المباشر (العدوى) عن طريق الجيوب الانفية ,وخمج الأذن الوسطى,والنشوه الولادى, والورم والتلقيح المباشر مثل تداول يدوي جراحي داخل الجمجمة (Diab et al., 1999; Ring et al. , 1999) .

تحدث معظم الاصابات الفايروسية والبكتيرية عن طريق الجهاز التنفسي بعد اضعاف الجهاز المناعي واختراق وسائل الدفاع للمضيف وحال اختراق الجهاز العصبي يستطيع الميكروب العيش بسبب قلة وسائل الدفاع داخل الدماغ مثل الأضداد, المتمم,الخلايا العدلة وخلايا البلعمة *Phagocytes* فيكون تضاعف الميكروب غير مسيطر عليه وتظهر علامات المرض خلالها (Zhang and Tuomanen ,1999). في حين تكتسب اغلب الاصابات المتسببة عن *E.coli* و *Streptococcus B* عن طريق المشيمة الى الوليد او تكتسب اثناء الولادة (Bortulussi et al.,1975) .

ويمكن تلخيص عبور البكتريا وامراضيتها في الجهاز العصبي كما ياتي :

1. الالتصاق والاستيطان في الطبقة المخاطية للجيوب الانفية .
2. غزو المسافات البينية القريبة وتجنب الوسائل الدفاعية .
3. الانتقال والعبور خلال حاجز الدماغ-الدم BBB ودخول سائل النخاع الشوكي CSF .
4. العيش والتكاثر في بيئة السائل الشوكي .

ويكون عبور البكتريا ودخولها الجهاز العصبي عن طريق الامتداد المباشر من العظام المصابة او عبر العصب الشمي مباشرة وكذلك العبور عن طريق الدم (Anderson et al. ,2000 ; Zhang and Tuomanen,1999) .

تستخدم البكتريا وسائل كثيرة في اضعاف دفاعات الجسم حيث تفرز انزيم *IgA* *Protease* لتحطيم *IgA* وتجنب نظام المتمم عن اليات مضادة للمتمم والخلايا الملتزمة عن طريق المحفظة اذ ان معظم البكتريا المسببة لخمج السحايا تحتوي المحفظة كما تلعب الاهداب دورا في التصاق البكتريا في الطبقة المخاطية في مجرى الانف البعومي ونتيجة لهذا يحدث السائل المخي الشوكي استجابة مناعية عادة تؤدي الى قتل البكتريا مما يسبب

ظهور حالات الالتهاب Inflammation, استسقاء الدماغ Brain Edema, جرح موضعي عصبي Injury Localized Neurologic والموت (Quagliarello and Scheld 1997 ; Tunkle and Scheld,1993).

B: فاقدة الجدار

ربما تسلك فاقدات الجدار مسارات الأمراض نفسها عن طريق الامتداد المباشر من العظام المصابة بالخمج وعبر العصب الشمي بشكل مباشر وعبر الدم في حالات تجرثم وتسمم الدم (Domingue *et al.* ,1997 ; Clasner,1972). ولكن هناك اليات التخفي Cryptization المرتبط بالتكرار والازمان وهناك امراض مناعي Immunopathogenesis ربما عن طريق امتلاكها ذرى مستضدية Epitopes مشابه لنظيراتها في أنسجة المفاصل , نسيج الدماغ على سبيل المثال لا الحصر وهذا التشابه يؤدي لاستجابة مناعية خلطية ذاتية او الاثنيين معا Autoimmune Response وربما تحوي هذه الكائنات الفاقدة الجدار ذرى مستضدية ذات مجال حاث لفرط الحساسية المتأخر Delayed Hypersensitivity يؤدي الى تفاعل فرط حساسية متأخر . وقد تشترك مع ظهور اضرار او وسائط خلوية ذات مجال مثبط للمناعة Immunosuppressive نتيجة الخمج بهذه الكائنات فاقدة الجدار (Domingue,1982 Domingue,1979 ; ; Domingue *et al.*, 1997)

2-7: أمراض *H. influenzae b* في حيوان المختبر (الفار الابيض)

تعد بكتريا *H.influenzae* ممرضة ضعيفة في الحيوانات التي لاتكون مضيف طبيعي لها ولذلك فشلت في الماضي محاولات لدراسة امراضيتها في بعض الحيوانات مثل الكلاب والقرود وخنازير غينيا باستثناء بعض المحاولات في ظهور امراضية ضعيفة جدا في القطط والفئران وخنازير غينيا واعتمدت الامراضية فيها على استخدام تراكيز عالية من العالق الميكروبي والحقن عن طريق البريتون او في الدماغ مباشرة (Moxon *et al.* ,1985).

ولكون إصابات بكتريا *H. influenzae b* ذات علاقة بالعمر وظهور مرض خمج السحايا في الاعمار اقل من 5 سنوات فقد اثار الانتباه الى استخدام الحيوانات الصغيرة في تحفيز الامراضية واستخدمت صغار الجرذان والفئران لهذا الغرض وهذا كفيل باحداث العلامات الاولى من المرض مثل الاستيطان في الانف البلعومي, والانتقال إلى مجرى الدم , والتجرثم الدموي وغزو الاغشية السحائية وهذا يعتمد على طريقة الحقن وموضع الإصابة اضافة الى تركيز الجرعة (Moxon *et al.* ,1977; Moxon *et al.* ,1985).

كما ذكر أن الفئران تعطي صورة لاصابة جرثومية عالية بالسحايا بطريقة الحقن داخل البريتون او التجريع الفموي اقرب مما عليه من البشر في الجرذان وبوفيات اقل (Marks *et al.*,1982). وامن اظهار علامات المرض بصورة كاملة باستخدام موديل الارنب المحقون مباشرة في الدماغ ولو بصورة ضعيفة اذ اعتبر هذا الموديل مفيدا في

دراسة فسلجة الامراضية او ظواهر ما بعد التحفيز (Scheld ,1980; et al. ,2003; Paul).

2-8: مناعة خمج السحايا في البشر

تشير الدراسات المختبرية في الكائن الحي ان مكونات المحفظة و LPS البكتريا اهم العوامل المسببة في تحفيز وسائط الخمج السحائي. إذ تلعب مكونات الجدار الخلوي وحامض التايكويك والبيتيدوكلايكان دورا مهما في فعالية الخمج وزيادة نفاذية حاجز الدماغ – الدم حيث يعمل المستضد البكتيري على تحفيز خلايا وحيدة النواة على انتاج الانترليوكين 1- (IL-1) ويحفز خلايا البلعم الكبير Macrophages والخلايا النجمية Astrocytes والخلايا الدبقية Microglia والخلايا البطانية Endothelial في الجهاز العصبي على انتاج عامل التنخر السرطاني (Tumor Necrosis Factor (TNF) Michel et al., 1996; Gray and Fedorko, 1992; Fassbender et al., 1996; et al., 2003).

تعد هجرة الخلايا العدلة Neutrophil إلى سائل النخاع الشوكي اهم احداث الامراضية فقد اقترح (Quagliarello and Scheld, 1997) ثلاثة أطوار في هجرة الخلايا العدلة إلى سائل النخاع الشوكي والذي ينتج عنها تحطيم حاجز الدماغ – الدم. يستغرق اول هذه الاطوار من 1-2 ساعة وتبدأ بتحرر السايوتوكين مثل IL-1 و TNF في سائل النخاع الشوكي استجابة لتضاعف او تحرر الثرومبين وتعزيز ارتباط الخلايا العدلة والخلايا البطانية Endothelial Cell بينما يشمل الطور الثاني تحرير IL-8 او عبور الخلايا العدلة إلى سائل النخاع الشوكي اما الطور الثالث فان السايوتوكين و عبور الخلايا داخل سائل النخاع الشوكي يؤدي إلى تحرر Platelet Activating Factor (PAF) و Leukotrienes و Prostaglandin ومكونات الأوكسجين السامة مما يؤدي إلى اضعاف حاجز الدماغ – الدم عن طريق اخذ الالبومين من الدورة الدموية بوساطة الخلايا البطانية وايضا السماح بتسرب الالبومين إلى سائل النخاع الشوكي من خلال فتح الارتباطات داخل الخلايا. ان هجرة الخلايا العدلة داخل سائل النخاع الشوكي تلعب دورا رئيسيا في زيادة نفاذية حاجز الدماغ – الدم وبالنتيجة ظهور حالة الاستسقاء الدماغية Edema اضافة إلى زيادة تركيز اوكسيد النتريك NO في سائل النخاع الشوكي (Granert et al., 2000; Mustafa et al., 1989; Gadoz et al. 1981).

يعد وجود الأضداد في الدماغ مشتق من المصل حيث تبلغ نسبة IgG و IgA (0.2-0.4) % تقريبا نسبة إلى مستوى المصل وتكون نسبة IgM قليلة لكبر حجمها, مع عدم وجود نظام لمفاوي ووجود عدد قليل او معدوم من الخلايا الملتزمة و المتمم (Quagliarello and Scheld, 1992).

ففي حالة حدوث اذى او خمج في حاجز الدماغ – الدم تمر الاضداد إلى الجهاز العصبي مع بروتينات المصل, تتحرك خلايا B من الدورة الدموية المحيطة إلى الفراغ المحيط وتولد جزيئات الكلوبولين المناعي, تكون الخلايا المتعددة النواة

Polymorphoneuclear (PMN) في الخمج في حالة الإصابة البكتيرية وترتبط مع عوامل الجذب يتوسطها المتمم اما الخلايا احادية النواة Monocyte السائدة في حالة الخمج الفايروسي وبكتريا التدرن الرئوي والفطريات , ففي حالة الإصابة الفيروسية تعبر الخلايا المتحسسة T الى الجهاز العصبي اولا ويتحرر اللمفوكين Lymphokin بواسطة هذه الخلايا ومن المحتمل يجدد دخول خلايا B والبلعم الكبير (Tunkle and Scheld ,1993).

تشمل الاستجابة المناعية المتمم والأضداد, والخلايا المتعددة النواة, اذ يزداد المتمم في حالة المرض وخاصة في البكتريا ذات المحفظة كذلك سجل الارتفاع في بعض حالات الإصابة الفيروسية حيث ان الاضداد والمتمم ضروريان في الاستساغة Opsonization للجراثيم المحفظة وكذلك البلعمة وازالتها من الدورة الدموية والطحال (Levidioton et al. ,1992; Lassiter et al. ,2004).

ان نسبة الاضداد في الدم الى سائل النخاع الشوكي تقارب 1:800 وتعمل هذه النسبة عند حدوث المرض لكن تبقى النسبة قليلة في سائل النخاع الشوكي مقارنة بالمصل المحفز. ان تحفيز الضد متأخرا في سائل النخاع الشوكي مع الاشارة الى تحفيزه مبكرا في بعض الحالات البكتيرية والفيروسية, أما ميكانيكية عبور الخلايا اللمفية فهي غير معروفة ولكن يعد سائل النخاع الشوكي جاذبات كيميائية لهذه الخلايا وتشير الدراسات إلى أن C5a هو الجاذبات الكيميائية لهذه الخلايا (Ernest et ; Smith et al.,1973). (Ernest et al.,1984

9-2: مناعة *H. influenzae b* في حيوان المختبر

توفر بكتريا *H. influenzae b* مناعة طبيعية في الجنين نتيجة عبور الاضداد عن طريق المشيمة اليه مما يقلل من خطر الإصابة بالسحايا في هذا العمر بينما يقل مستوى الاضداد بتقدم العمر فتزداد الإصابة في الاطفال اقل من 5 سنوات بينما ترتفع نسبة الاضداد في البالغين لذلك تقل الإصابة. فقد أشارت دراسات كثيرة على وجود مناعة طبيعية لهذه البكتريا والتي قد تنشأ من تفاعل تصالبي لمستضدات معوية, اذ ان تكون الاضداد الخاصة للبكتريا او المحفظة في الدم مرتبط بالعمر (Anderson et al ,1972; Myerowitz and Norden ,1977; Ocakton et al. ,2004).

تعد الأضداد مفتاح المناعة ضد *H. influenzae b* فقد أمكن دراسة الموديل المناعي للبكتريا في الجرذ والارنب وقد اظهرت مناعة خلطية متمثلة باصناف الاضداد وهذا ممكن شرحه بحقيقة ان الضد المحضر ضد خلايا *H. influenzae b* يتفاعل بكفاءة مع السلسلة الجانبية Oligosaccharide الموجودة في نهاية الطور اللوغاريتمي او طور الثبات للبكتريا , كما امكن دراسة الموديل المناعي في الفئران واطهر مناعة خلطية متمثلة بالاضداد اذ اجمعت الدراسات على ان الذرى المستضدية لمتعدد السكريد المحفظي او للغشاء البروتيني الخارجي لبكتريا *H. influenzae b* تعد خلطيه وغير معتمدة على الخلايا التائية T الا ان هذه الذرى قد تختلط بطبيعتها مع ذرى اخرى مما قد يحول نمط

التنشيط المستضدي من غير معتمد الى معتمد على الخلاياT وهذا ما يستخدم في اللقاحات (Wispelwey *et al.*, 1982). (Marks *et al.*, 1982; Loeb and Smith, 1982; *al.*, 1989

10-2 : طرائق التشخيص لخمج السحايا البشري

تشارك مجموعة من الفحوصات لتوثيق التشخيص النهائي لخمج السحايا في البشر فضلا عن الأعراض السريرية, إذ يسحب السائل المخي الشوكي بتقنية وخز المنطقة القطنية الثالثة او الرابعة والخامسة بواسطة ابرة معقمة وتعتبر هذه الخطوة مهمة لغرض اجراء التشخيص والتعرف على المسبب المرضي حيث يتم اجراء عدد من الفحوصات على عينة السائل المخي الشوكي منها الفيزيائية, الكيمياء, البكتريولوجية, السيرولوجية والوراثية (Spach and Jakson, 1999).

A: طرائق التشخيص البكتيري

تشمل هذه الطرائق صبغ عينة السائل المخي الشوكي بصبغة الكرام او الصبغة المقاومة للحمض لتشخيص البكتريا بعد نبذه ان وجدت بكميات كثيرة وزرع عينة السائل المخي الشوكي مباشرة بعد ترسيبها وتركيزها في اوساط الزرع الروتينية لتنمية البكتريا (Gray and Fedorko,1992) .

B: طرائق التشخيص المناعي

يتبع في التشخيص السريع لمرض السحايا مجموعة من الفحوصات المناعية تشمل الاستجابة الخلوية والسايولوجية غير المتخصصة للخلايا البيض في سائل النخاع الشوكي ,وطرق اخرى يتم فيها تشخيص الانتجين في السائل الشوكي منها فحص اللاتكس (LA) Latex , الانتشار المناعي المعاكس Counterimmunoelectrophoresis (CIE) والتلازن Coagulation (CoAG) إضافة إلى طرق أخرى مثل فحص Enzyme- Gas Liquid و (ELIZA) Linked Immunosorbent Assay (Tunkle and Scheld C –Reactive Protein و (GLC) Chromatography (1997) .

إن فحص اللاتكس أكثر الطرق المناعية المستخدمة في تشخيص المستضد البكتيري باعتباره فحص سريع ونوعي وذو حساسية عالية بنسبة 90-100% وقد ذكر أن الفحص يكون موجبا بنسبة 93% في الحالات المتسببة عن *N.meningitidis* و 84% في الحالات المتسببة عن *H.influenzae b* و 77% في حالات الإصابة المتسببة عن *S. pneumoniae* (Sipple et al.,1984) .

Chapter Three الفصل الثالث المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3: المحاليل و الصبغات و الكواشف البكتريولوجية

1-1-3: المحاليل

1- محلول الملح الطبيعي Normal Saline

حضر بإذابة 0.85 غم من مادة كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر. و عقم بالظروف الاعتيادية بالالتوكليف بدرجة حرارية 121 م و لمدة 15 دقيقة وضغط 1 جو . استخدم في التخفيف و تحضير العوائل البكتيرية

2-1-3: الصبغات

1- صبغة كرام Gram Stain : حضرت وفق ما جاء في (Cruickshank *et al.* , 1975)

2- صبغة دينيز Dienes Stain حضرت حسب طريقة (Domingue ,1982) استخدمت هذه الصيغة في تصيبغ البكتريا فاقدة الجدار على الأوساط الصلبة .

3- صبغة ليشمان Leishman Stain : حضرت وفق ما جاء في (Cruickshank *et al.* , 1975). استخدمت في تصيبغ سائل النخاع الشوكي على الشرائح الزجاجية.

3-1-3: الكواشف

حضرت كواشف الاختبارات الكيماوية الحيوية للتعرف على العزول البكتيرية وفق ما جاء في (Cruickshank *et al.* , 1975) كما يلي:

الاختبار	اسم الكاشف
الانتول	P-dimethylaminobenzaldehyde Kovacs Reagent كاشف كوفاكس
الاوكسيديز	Tetramethyl-P-phenylenediaminehydrochloride Oxidase Reagent كاشف الإنزيم المؤكسد
فوكس بروسكور	Alpha- naphthol & KOH كاشف الفانافول و هيدروكسيد الصوديوم
النترات	Nitrate Reagent كاشف النترات
الكاتاليز	3% H2O2 Catalase Reagent كاشف الكاتاليز
أحمر المثيل	Methyl Red كاشف أحمر المثيل

2-3: المحاليل المناعية

1- المحلول الملحي الفورماليني Formal Saline

حضر بإضافة 0.5 مل من الفورمليدهيد الى 99.5 مل من المحلول الملحي المعقم (0.85%) ليصبح التركيز النهائي للفورمالين (0.5%) استعمل في تحضير مستضدات البكتريا السالبة لصبغة كرام ومذيب للكلوبيولينات المناعية الافرازية (Lehman *et al.* , 1968)

2- محلول البنزال كونيوم كلورايد Benzal Konium Chloride

حضر بتركيز 1:1000 بإضافة 0.2 مل من Alkyl Benzyl Dimethyl Ammonium Chloride (C₂₂H₄₀ClN) (الوزن الجزيئي 238 دالتون) الى كمية قليلة من الماء المقطر المعقم و بعد التحريك اكمل الحجم النهائي الى 100 مل استخدم في تحضير مستضدات البكتيريا الموجبة لصبغة كرام (McCoy & Kennedy, 1960).

3- محلول منظم ترس Tris Buffer

حضر بإذابة 12 غم من مادة ترس (NH₂C(CH₃OH)₃) شركة TAAB (الوزن الجزيئي 121.14) في كمية قليلة من الماء المقطر و اكمل الحجم النهائي الى لتر، تم تعديل الاس الهيدروجيني pH الى 7 باستعمال حامض الهيدروكلوريك (0.1 N) HCl. استخدم هذا المحلول في تحضير محلول الكلايكلول متعدد الاثيلين (Johnstone & Thorpe, 1982).

4- محلول ثاني مركبتو ايثانول 2-Mercapto Ethanol

حضر بتركيز 0.05 مولاري بإضافة 3.9 مل من هذه المادة (HS-CH₂-CH₂-CH₂-OH) شركة Collbiochem (الوزن الجزيئي 78.1 التركيز داخل عبوة الشركة 12.8 مولاري) الى كمية قليلة من المحلول الملحي الطبيعي و اكمل الحجم النهائي الى لتر. استعمل لمعرفة مدى تأثير الاضداد المناعية الافرازية و الاضداد المناعية المصلية به كعامل مختزل (Cruickshank et al., 1975).

5- محلول ازاييد الصوديوم Sodium Azide

يحضر بإذابة 1 غم من ازاييد الصوديوم (NaN₃) شركة BDH (الوزن الجزيئي 65.01) في 100 مل من الماء المقطر المعقم. بحيث يصبح التركيز 1% استعمل في حفظ عينات المصل لمدة طويلة (Frei et al., 1995).

6- محلول البايوريت Biuret Solution

حضر بإضافة 3 غم من مادة كبريتات النحاس (CuSo₄ 5H₂O) شركة BDH (الوزن الجزيئي 249.5) في نصف لتر من الماء المقطر و تم اضافة 9 غم من مادة تترات الصوديوم - البوتاسيوم (NaKC₄H₄O₆ 4H₂O) شركة BDH (الوزن الجزيئي 166) و 5 غم من يوديد ال بوتاسيوم KI و بعد إذابة هذه المكونات الثلاثة تم اضافة 100 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 0.6 عياري و تم اكمال الحجم النهائي الى لتر بإضافة الماء المقطر و تم استعمال هذا المحلول في طريقة بايوريت لغرض قياس تركيز الكلوبولين المناعي الافرازي و قياس تركيز البروتين الكلي في المصل (Bishope et al., 1985).

7- محلول الألبومين وتخفيفه القياسية Standard Albumin Solution

حضر بإذابة 60 غم من الألبومين البقري المجفف (الوزن الجزيئي 65400) شركة BDH في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.6 عياري و اكمال الحجم النهائي إلى لتر للوصول الى التركيز النهائي للألبومين 60 غم/لتر. و من هذا المحلول تم

تحضير التخافيف القياسية (1:1,2:1,4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1) والتي تمثل التراكيز (60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.9375, 0.46875) غم/ لتر على التوالي ، استعمل هذا المحلول لغرض تحضير المنحني القياسي (Standard Curve) لمعرفة تراكيز الكلوبيولينات المناعية الافرازية و تركيز البروتين الكلي (Bishop et al. , 1985) .

8- محلول السيفر Alsever's Solution

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 24.6 غم من مادة الكلوكوز شركة (BDH) و9.6 غم من مادة سترات الصوديوم الثلاثية شركة (TAAB) و5.04 غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl شركة (BDH) في 1200 مل من الماء المقطر و عدل الاس الهيدروجيني الى 6.1 بوساطة 15% حامض الليمون Citric Acid ثم رشح المحلول بمرشح دقيق حجم ثقبه 0.22 مايكروميتر. استعمل هذا المحلول في تحضير عالق كريات الدم الحمر للاغنام (Garvey et al. , 1977).

9- محلول حامض التانيك Tannic Acid

حضر هذا المحلول بإذابة 0.005 غم من مسحوق حامض التانيك (C76 H32 O48) شركة BDH (الوزن الجزيئي 1701.22) في كمية قليلة من الماء المقطر و اكمل الحجم النهائي الى 100 مل. استعمل المحلول في ازالة المستضدات الموجودة على سطح كريات الدم الحمر للاغنام (Garvey et al. , 1977).

10- محلول استيت الصوديوم الايثيلي Ethyl Sodium Acetate

حضر بإذابة 1 غم من مادة استيت الصوديوم Sodium Acetate (CH3COONa) شركة BDH (الوزن الجزيئي 8203) في 10 مل من الكحول الايثيلي المطلق . استعمل المحلول في تحضير مستضد المحفظة (Kwapinski , 1972).

3-3: الأوساط الزرعية

A: الأوساط البكتيرية

حضرت الأوساط الغذائية الزرعية حسب تعليمات الشركة المنتجة و عقت في الموصدة بدرجة 121م لمدة 15 دقيقة باستثناء بعض الأوساط التي تتلف بالحرارة

اسم الوسط	الشركة المنتجة	نوعه	طريقة التحضير	الهدف من استخدامه
أكار الدم Blood Agar	Mast	تفريقي و أغنائي	حضر بإضافة 5% من الدم إلى وسط Blood Agar Base المعقم بالظروف الاعتيادية والمبرد إلى 45 م	تمييز البكتريا المحللة للدم عن غير المحللة
أكار الماكونكي MacConkey Agar	Mast	انتقائي	حضر بإضافة 51.5 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تمييز البكتريا المعوية المخمرة للاكتوز عن غير المخمرة
نقيع المخ و القلب Brain Heart	Oxoid	أغنائي	حضر بإضافة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تنمية البكتريا و تنشيطها وإدامتها

				Infusion Broth
تمييز بكتريا المكورات العنقودية المخمرة و غير المخمرة للمانيتول	حضر بإضافة 11 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	Mast	المانيتول الصلب Manitol Salt Agar
تنمية البكتريا فاقدة الجدار	حضر بإذابة 37 غم من مستخلص المخ و القلب السائل و100 غم من السكر و 5 غم من خلاصة الخميرة (Mast) في 1000 لتر من الماء المقطر، بعدها ضبط الأس الهيدروجيني 7.4-7.6 و وزع الوسط في أنابيب زجاجية و عقم (Domingue, 1982)	أغنائي	حضر مختبريا	الفارينت السائل Variant Broth (VB)
تنمية البكتريا فاقدة الجدار	حضر بإضافة 12 غم من الاكار إلى وسط الفارينت السائل (VB) و عقم في الظروف الاعتيادية . (Domingue, 7.4-7.6 pH 1982)	أغنائي	حضر مختبريا	الفارينت الصلب Variant Agar (VA)
تنمية بكتريا <i>N. meningitis</i> <i>H. influenzae</i>	حضر بإضافة 5% من الدم إلى وسط الاكار المغذي المعقم و سخن في حمام مائي بدرجة 70-80 لمدة 10 دقائق.	أغنائي	حضر مختبريا	أكار الدم المسخن Chocolate Agar
التحري عن قدرة البكتريا على تخمر السكريات وإنتاج حامض و غاز	يتكون من المحلول الأساس ومحلول السكر حضر وفقا لـ (MacFadin , 2000)	تفريقي		وسط تخمير السكريات Sugar Fermentation
التحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز	حضر بإضافة 5 مل من محلول 40% يوريا معقمة إلى وسط اساس اليوريا	تفريقي	Oxoid	اكار اليوريا Urea Agar
التحري عن قدرة البكتريا على اختزال النترات إلى نترت	حضر بإضافة 11.5 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	Mast	مرق النترات Nitrate Broth
التحري عن قدرة البكتريا على إنتاج جذر الاندول	حضر بإذابة 15 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	Fluka	ماء البيبتون Peptone Water
تنمية بكتريا <i>L. monocytogenes</i>	حضر حسب ما جاء في (MacFadin , 2000)	أغنائي	----	وسط الاسكولين الصلب Escolin Agar
الكشف عن قدرة البكتريا على تخمير السكريات وإنتاج غاز H ₂ S	حضر بإضافة 0.06 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	---	Oxoid	أكار الكلكر و الحديد الصلب Kligler Iron Agar
الكشف عن قدرة البكتريا على التحلل الكلي والجزئي لسكر الكلوكوز	حضر بإذابة 17 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	Oxoid	احمر المثيل و الفوكس بروسكور Methyl Red & Vogues Proskuar
الكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات	حضر بإذابة 24.2 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	---	استهلاك السترات Citrate Utilization

كمصدر وحيد للكربون				
الكشف عن قابلية البكتريا على الحركة	حضر بإذابة 8 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر	تفريقي	Difco	وسط الحركة Motility

B: الاوساط المناعية

- وسط أكار A : (Mast) Agar A

حضر حسب تعليمات الشركة و استعمل في دراسة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض الجهازية و الموضعية .

- محلول الايكل الأساس Basal Medium Eagle

حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة (Sigma) كما يلي:-

1. إذابة 1 غم من المادة الأساس في 100 مل من الماء المقطر المعقم.
2. ترشيح المحلول المحضر مباشرة من خلال وحدة المرشح الدقيق Millipore Whatman 0.22 Mm.
3. حفظ المحلول في الثلاجة و استعمل في تثبيط هجرة الخلايا البيض . Leucocytes Inhibition Factor (LIF)

4-3: مواد مصنعة نبيذة

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| Sterilin , England | - اطباق بتري بلاستيكية |
| Whatman, 0.22 Mm, 0.45 Mm | - المرشح الغشائي |
| Meheco-China | - سرنجات مختلفة الاحجام |
| Meheco-China | - شرائح زجاجية و اغطية |
| AFMA-Dispo | - انابيب بلاستيكية معقمة |

5-3: الأجهزة

- | | |
|--|------------------------------|
| Webeco- GmbH , Germany | - الموعدة |
| Kriazy – Egypt | - الثلاجة |
| Damon – IEC, Division U.S.A | - جهاز النبذ المركزي |
| Memmert, Germany | - فرن |
| Memmert, Germany | - حاضنة |
| Griffin & Geory Ltd, U.K | - المازج |
| W.H.O. International Reference | - جهاز قياس العكورة |
| Preparation of Opacity. Holly Hit, Hampstead. London | |
| NW.36, England | |
| Olympus, Japan | - مجهر ضوئي مركب |
| Thermed 5001 , G.F.L. Germany | - حمام مائي |
| Philips, Holand | - جهاز قياس الأس الهيدروجيني |
| Cottingen /W- Germany | - وحدة الترشيح الفائق |
| Shaker, Germany | - جهاز الهزاز |

Haematocritet. H. Microcentrifuge

- جهاز النبذ المركزي للدم

6-3: العينات

A: المرضى Patients

تم إجراء البحث في مستشفى بابل للولادة و الأطفال للفترة من 1-5-2004 و لغاية 1-5-2005. إذ تم جمع 93 عينة من السائل المخي الشوكي CSF من قبل الطبيب المختص من مرضى يشك بهم التهاب السحايا. و كانت منهم 50 إصابة أكيدة بالتهاب السحايا في الأطفال بأعمار أكبر من شهر و اقل من 5 سنوات اعتمادا على التشخيص السريري و السايولوجي .

B: السيطرة

اعتبرت الحالات السالبة لفحص CSF السايولوجي مجموعة سيطرة سالبة لقياس البروتين المناعي و السكر و البروتين الكلي في العينة و اختير مجموعة من الأطفال الأصحاء مجموعة سيطرة موجبة لقياس تراكيز البروتين الكلي في المصل و أصناف الكلوبولين المناعي و المتمم في فحص الانتشار المناعي Radialimmunodifusion (RID) إضافة إلى القيم المرجعية ، و كما يلي أعداد المرضى و السيطرة في الدراسة :-

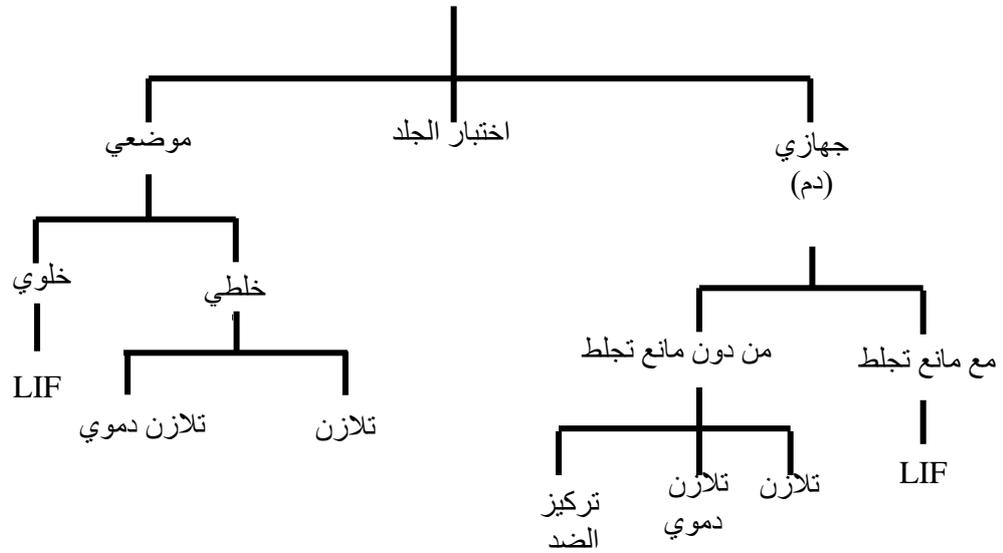
العدد	المرضى
50	الصورة السريرية و السايولوجية لمرضى لديهم خمج سحايا مؤكدة
43	الصورة السريرية و السايولوجية لم يكن لديهم خمج سحايا
93	عدد المرضى الكلي المشتبه بهم خمج سحايا
	السيطرة
12	أسوياء من الناحية السريرية
---	قيم مرجعية

جرت المتابعة حول:

1. الاعراض العصبية.
2. الوفاة.
3. فحص ما بعد الوفاة.
4. تحضير مسحات مباشرة.
5. تحضير مقاطع نسيجية.

ج. الأرناب تمنيع

مستضد المحفظة وبروتين الغشاء الخارجي ومساعد مناعي يحقن منفصلاً بآن واحد ولأكثر من جرعة



8-3: جمع العينات Collection Of Specimens

1-سائل النخاع الشوكي CSF:

تم سحب سائل النخاع الشوكي من كل طفل من المنطقة القطنية للعمود الفقري بطريقة وخز المنطقة القطنية Lumbar Puncture على يد الأطباء المختصين و بمقدار 3-5 مل توزع العينة في ثلاث أنابيب اختبار معقمة الأول تجرى عليه الفحوصات

الخلوية و البكتريولوجية و الأنبوب الثاني تجرى عليه الفحوصات الكيموحيوية و الأنبوب الثالث يستخدم لتحضير مستخلص CSF لقياس تركيز البروتين الافرازي و الفحوصات المناعية.

2- المصل

تم سحب 2.5-3 مل من الدم من كل طفل مصاب و من الاسوياء من الوريد العضدي بواسطة محاقن طبية نبيذه و يوضع الدم في انابيب بلاستيكية معقمة دون مانع للتجلط للحصول على مصل الدم.

3- معاملة العينات:

1- الصفات المظهرية و القوام Consistency & Appearance:

تم ملاحظة اللون لكل عينة من خلال المقارنة بانبوب اخر يحوي ماء مقطر لتمييز العكورة.

2- حساب عدد الخلايا البيض في السائل المخي الشوكي Cells Count Of CSF:

تم حساب العدد الكلي للخلايا البيض باستخدام Neubauer Chamber اذ ثبت الغطاء الزجاجي Cover Slip فوق الشريحة، ثم وضعت قطرة من العينة بواسطة انبوبة شعرية و على جانب الغطاء الزجاجي لتنتشر تحت الغطاء ثم فحصت تحت المجهر (Gray and Fedorko,1992;WHO,1980). أما حساب عدد الخلايا التفريقي Differential Cells فيكون بإضافة قطرات من صبغة ليشمان على السلايد لتمييز خلايا الدم البيضاء و تفريقها (WHO, 1999).

3- قياس تركيز البروتين الكلي في عينة CSF

وضعت العينة في الأنبوب الثاني في جهاز النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، و تم فصل الرائق عن الراسب و استعمل الرائق لتقدير تركيز البروتين و سكر الكلوكوز في CSF.

استخدم في تقدير تركيز البروتين الطريقة المعتمدة من قبل شركة Randox

Laboratories Ltd (United Kingdom) -والمتكونة من محلول الكاشف

اللونى Color Reagent و المحلول القياسي Standard Solution و كما يأتي:-

1. حضر محلول الـ Blank بإضافة 20 ميكروليتر من الماء المقطر و أضيف إليه 1000 مايكروليتر من الكاشف في انبوبة اختبار معقمة.
2. حضر محلول الـ Standard بإضافة 20 ميكروليتر من محلول الـ Standard اضيف إليه 1000 مايكروليتر من الكاشف في انبوبة اختبار معقمة.
3. وضع 20 مل من رائق CSF في انبوبة اختبار و أضيف إليه 1000 مايكروليتر من الكاشف.
4. وضعت الانابيب لمدة 10 دقائق في درجة 25 م او 5 دقائق في درجة 37 م.
5. تقاس الكثافة الضوئية للمحاليل بواسطة جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 600 نانوميتر و تطبق المعادلة التالية:

$$\text{Protein Concentration (g/L)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times \text{Standard Concentration}$$

علما أن مكونات الكاشف كالآتي:-

المحتويات	التركيز الأولي للمحاليل
الكاشف الملون Color Reagent Pyrogallol Red Disodium Molybdate Succinic Acid Sodium Oxalate Sodium Benzoate	--- 60 ميكرومول/لتر 40 ميكرومول/لتر 150 مليمول/لتر 1 مليمول/لتر 3 مليمول/لتر
Standard Solution المحلول القياسي	---
Protein (Human Serum Albumin)	1 غم/لتر

4- قياس تركيز السكر في عينة CSF

استخدمت الطريقة المعتمدة من قبل شركة Radox Laboratories Ltd.

United Kingdom و كما يلي :-

1. اخذ 20 مايكروليتر من العينة (Sample) او المحلول القياسي (Standard) و اضيف اليه 2000 مايكروليتر من الكاشف في انبوبة اختبار معقمة.
2. حضر محلول الكفيء Blank باضافة 2000 مايكروليتر من الكاشف في انبوبة اختبار معقمة.
3. وضعت الانابيب لمدة 25 دقيقة بدرجة 15-25 م او 10 دقائق بدرجة 37 م .
4. تم قياس الكثافة الضوئية بطول موجي 540 نانوميتر .
5. طبقت المعادلة التالية:-

$$\text{Sugar Concentration (g/L)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 5.55$$

مع العلم أن مكونات الكاشف هي:-

المحتويات	التركيز الاولي للمحاليل
محلول البفر Buffer	---
Phosphate Buffer	0.1مول/لتر Ph 7.0
Phenol	11مليمول/لتر
GOD-PAP-Reagent	---
4-Aminophenazone	0.77مليمول/لتر
Glucose Oxidase	> 1.5 ku/1
Peroxidase	> 1.5 ku /1
المحلول القياسي Standard Solution	---
Glucose	5.55 مليمول/لتر (100 mg / dl)

9-3: طرق الزرع الاعتيادية

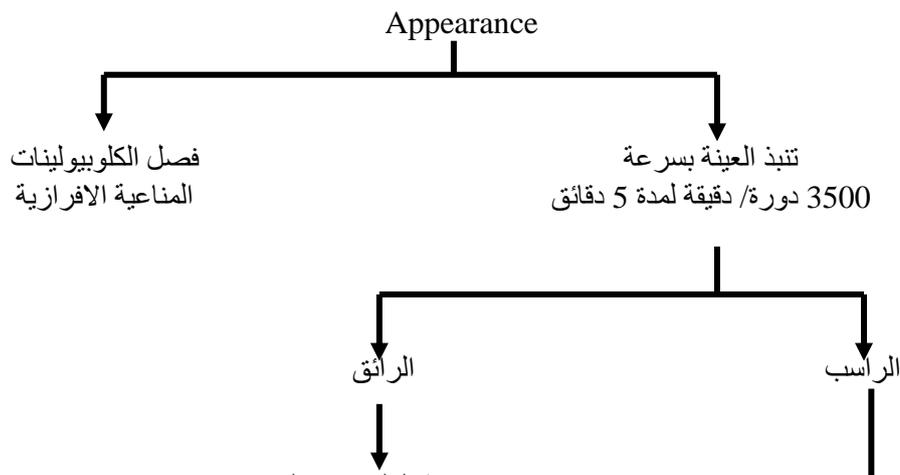
- الزرع المختبري للسائل المخي الشوكي : تم تلقيح الاوساط التالية من راسب كل عينة:

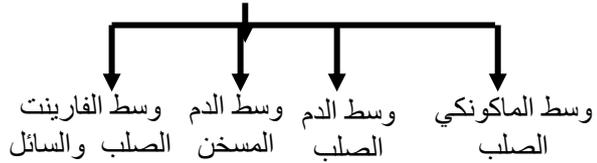
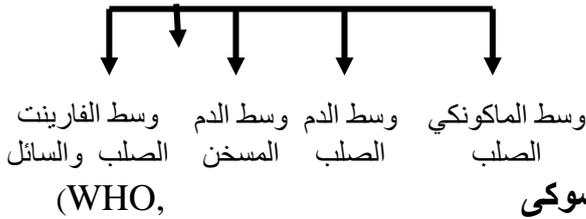
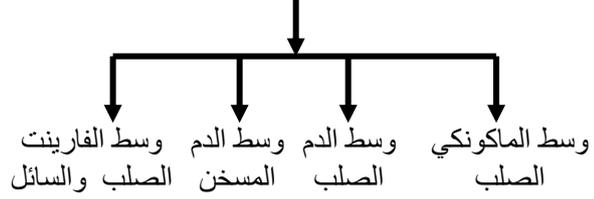
- وسطين من اكار الدم الصلب (Mast) Blood Agar احدهما حضن هوائيا و الاخر حضن بظروف 10-5 % CO₂ .
- وسط اكار الدم المسخن Choclote Agar حضن بظروف 10-5 % CO₂ .
- وسط اكار الماكونكي (Mast) MacConkey Agar حضن هوائيا.

10-3: طرق زرع فاقدة الجدار

- تم تلقيح وسطين من اكار الفارينث Variant Agar احدهما حضن هوائيا و الاخر بظروف 10-5 % CO₂ مضاف اليه نسبة من الدم المسخن, حضنت الاوساط الزرعية بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة باستثناء وسط الفارينث يحضن مدة 2-5 ايام متتالية لمتابعة نمو بكتريا فاقدة الجدار.
- و يوضح الشكل (1) كيفية التعامل مع عينة CSF و طرق الزرع و الاختبارات المستخدمة على العينة.

عينة السائل المخي الشوكي (CSF)





الشكل (1): الخطوات المتبعة مع عينة السائل المخي الشوكي

(WHO, 1980, 1999; Gray and Fedorko, 1992)

11-3: طرق التعرف الاعتيادية

تم التعرف و تشخيص النمو البكتيري حسب ما جاء في (MacFadin, 2000) من خلال:-

- دراسة الخصائص المظهرية و الزرعية للمستعمرات النامية لكل عينة.
- الفحوصات المجهرية و تفاعلات صبغة الكرام.
- التفاعلات الكيموحيوية لكل عزلة.
- استخدام نظام التشخيص Epi-20.E في تحديد هوية الكائن المجهرى اعتمادا على طريقة الشركة المنتجة.
- تحديد النوع المصلي .

- الشكل الخارجي

تم تحضير مسحات مباشرة من المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية المختلفة و صبغها بصبغة الكرام، كذلك جرى تصبغ المستعمرات النامية على وسط الفارينت الصلب (فاقدات الجدار) بصبغة دينز.

- الخصائص المزرعية Culture Characteristics

تم دراسة النمو مظهريا على الاوساط الصلبة اما الاطباق التي لا يوجد فيها نمو في اليوم الثالث من الحضانة فتمت حضانتها مرة اخرى مدة يومين قبل ان تعد سالبة الزرع. المستعمرات التي تعطي مظهر البيض المقلبي او كونها Tiny تعد مستعمرات بكتريا فاقدة الجدار

تجرى الفحوصات الكيموحيوية التالية على المزرعة النقية المستحصلة من المستعمرات النامية.

Catalase Test	- اختبار إنزيم الكاتاليز
Oxidase Test	- اختبار إنزيم الأوكسيديز
Coagulase Test	- اختبار إنزيم التجلط
Bile Solubility Test	- اختبار ذوبان املاح الصفراء
Urease Test	- اختبار انزيم اليوريز
Reduction Of Nitrate Test	- اختبار اختزال النترات
Indol Production Test	- اختبار انتاج الاندول
Methyl Red Test	- اختبار احمر المثيل
Voges- Proskuar Test	- اختبار الفوكس بروسكور
Citrate Utilization Test	- اختبار استهلاك السترات
Motility Test	- اختبار الحركة
Kliglers Iron Agar Reaction	- التفاعلات على اكار الكليكلروالحديد
Haemolysis Test	- اختبار تحلل الدم
Optochin Sensitivity Test	- اختبار الحساسية للابوتوكين
Bacitracin Sensitivity Test	- اختبار الحساسية للباسيتراسين
Lysine Decarboxylase Test	- اختبار اللايسين
Sugar Fermentation	- تخمر السكريات
Satalitizem Test	- اختبار التبعية
H ₂ S Production Test	- انتاج H ₂ S
Inuline Test	- اختبار تخمر الانيولين
	- النمو في الظروف الهوائية و قليلة الاوكسجين
	- النمو في درجات حرارية مختلفة

- الحاجة الى عاملي X و V :

استخدم هذا الفحص في الكشف عن بكتريا *H. influenzae b* اذ تم نشر العالق البكتيري المحضر على وسط الاكار المغذي بواسطة مسحة قطنية معقمة ثم تثبتت أقراص x و v و (Oxoid) على سطح الاكار الملقح، تحضن الأطباق بدرجة 37 م لمدة 18-48 ساعة بوجود 5-10 % CO₂.

- تحديد النوع المصلي لـ *H. influenzae b* :-

تم اختبار العزلات المحفوظة مصليا باستخدام اختبار التلازن على الشريحة الزجاجية Slide Agglutination Test مع المصل الضدي لبكتريا *H. Influenzae b* (Wellcogen Hib Antisera) المجهز من قبل شركة Mereux وذلك بمزج قطرة من معلق المستعمرات المراد اختبارها المحضر في محلول الملح الفسيولوجي مع قطرة من المصل الضدي على سطح شريحة زجاجية نظيفة مع مراعاة اجراء اختبار السيطرة بمزج قطرة من محلول الملح الفسيولوجي مع قطرة من محلول السيطرة، تقرأ النتيجة بظهور التلازن خلال دقيقة-دقيقتين و يوضح الجدول (1) التعرف البايوكيميائي الحيوي للبكتريا المعزولة :-

الجدول(1): الفحوص البايوكيميائية التأكيدية للعزلات البكتيرية ذات الجدار و فاقدة الجدار*

<i>Candida sp.</i>	<i>H. influenzae b</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>	النتيجة الاختبار
+	-	+	+	+	+	-	صبغة كرام
	+		-	-	-	-	فحص الأوكسيديز
	+	+	+	+	+		فحص الكاتاليز
	-	-				+	فحص اليوريز
						+	استهلاك السترات
	A	A				+	انتاج حامض و غاز من كلوكوز
	-	V	+	+		+	اللاكتوز
	-	-		+	+		سكرور
	-	A			+	+	مانيتول
		+				+	رامينوز
	A	-					زايلوز
		+				+	فحص الفوكس بروسكور
		+				-	احمر المثل
	V	-			-	-	انتاج الاندول
	-	-		-	-	-	انتاج H ₂ S
	-	+		-	-	-	الحركة
					+		انتاج الصبغة الصفراء
					+		الانزيم المخثر للبلازما
	+		+	+			اختبار النمو تحت ظروف 10-5 % CO ₂
	+						اختبار عوامل النمو X و V
	+						اختبار التبعية
	-	B+	β+	α+	β+		اختبار تحلل الدم
	+	-		-	+		اختبار اختزال النترات
	+			+			اختبار ذوبان املاح الصفراء
	-			+			اختبار تخمر الأنيولين
				+			اختبار الحساسية للأوبتوكين
					+		اختبار النمو بتركيز ملحي 5% ، 6% ، 7.5%
		+					الحركة في درجة 22 م
		+					تحلل الاسكولين
			مقاوم				اختبار الحساسية لـ Bacitracin

+ :نتيجة موجبة - :نتيجة سالبة A :حامض β : تحلل دموي كامل V : متغير * (MacFadin,2000)

3-12: موديل الفأر الأبيض لخمج السحايا

1- حث فقد الجدار البكتيري باستعمال البنسيلين

- تم استخدام المضاد الحيوي البنسيلين بتركيز 1000 وحدة دولية في وسط الفاريننت السائل حيث لقت 5 انابيب من هذا الوسط بالبكتريا المراد حثها على فقد الجدار مختبرياً .
- حضنت الانابيب بدرجة 37 م لمدة 18, 24, 72, 96, 120 ساعة بظروف 20 % CO₂ .
- تم متابعة النمو الجرثومي و التغيرات الحاصلة في الخلايا البكتيرية.
- اخذ 5 مل من المزروع السائل من كل مدة حضانة و نبذ بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق.
- ترك الرائق وفحص الراسب بالتحضير الرطب و المسحة المصبوغة.

- عند التأكد من حصول التحول الى فاقدات الجدار، يعمل العالق المقارب لـ 1 وحدة دولية لحقنة في الحيوان المختبري (Clin & Lawson, 1976).

2-العدوى التجريبية

استخدمت في الدراسة فئران من سلالة balb/c(Mus musculus) بأوزان 30-25 غم و اعمار متقاربة. قسمت الحيوانات الى مجاميع تمثل المجموعة الاولى الحقن عن طريق القحف والمجموعة الثانية الحقن عن طريق الوريد و المجموعة الثالثة تركت بدون حقن كسيطرة ، تم حقن 0.1 مل من تركيز 1 وحدة دولية / مل و 10 وحدة دولية / مل من عالق بكتيريا *H. influenzae b* المحضر لكل من بكتريا ذات الجدار و فاقدة الجدار و بمعدل 2 حيوان لكل تجربة كموديل اولي لمعرفة التأثيرات المرضية. جرى مراقبة سلوك الحيوان الظاهري لمشاهدة العلامات المرضية العصبية و تطور الحالة. و بعد موت الحيوان شُرح مباشرةً و استخرج الدماغ بعد قص عظم القحف. تم تحضير مسحات مباشرة من السائل المحيط بالدماغ و صبغها بصبغة الكرام لملاحظة وجود البكتريا و خلايا الدم المهاجرة. ثم تم تثبيت الدماغ بمحلول 10 % فورمالين لحين اجراء عملية الطمر بالبارافين و عمل المقاطع النسيجية (Chiavolini et al., 2004).

3-13: الدراسة المناعية على المرضى

1- تحضير المستضدات الجرثومية

a. تحضير المستضد السطحي للبكتريا سالبة الكرام المقتول حرارياً Heat Killed Bacterial Ag.

استخدمت طريقة (Svanborg-Eden et al., 1985) مع اجراء بعض التحويلات :-

1. حضرت مزرعة نقية للبكتريا السالبة الكرام على الوسط الصلب.
2. اضيف 6 مل من محلول الملح الفورماليني على سطح الطبق الحاوي على المزرعة البكتيرية ثم جرف النمو من على سطح الطبق بوساطة عروة ناقلة معقمة.
3. جمع المغسول بشكل عالق ومزجه باستعمال جهاز المازج لمدة 3 دقائق.
4. اخذ 5 مل من العالق ونبذ مركزياً بسرعة 4000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
5. ثم رمي الرائق و تعليق الراسب لغرض غسله بوساطة 5 مل من محلول الملح الفورماليني و يندب مركزياً بعد مازجته بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
6. تم رمي الرائق و تعليق الراسب بوساطة 5 مل من محلول الملح الفورماليني ومزجه بجهاز المازج.
7. اخذ 1 مل من هذا العالق و وضع في انبوبة جهاز قياس العتومة WHO, Standard Opacimeter و اكمل الحجم في الانبوبة باضافة محلول الملح الفورماليني الى ان تصبح عتومة العالق مساوية لعتومة الانبوبة القياسية فيصبح التركيز النهائي للعالق المستضدي 10 وحدات دولية.
8. مزج بجهاز المازج لمدة 3 دقائق.
9. وضع العالق المستضدي في حمام مائي بدرجة 60 م لمدة نصف ساعة.

10. تم اجراء فحص العقم Sterility Test على العالق المستضدي و ذلك باخذ لقاحه بواسطة عروة ناقلة معقمة من هذا العالق و تخطيطها على وسط مغذ صلب، ثم تحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، في حالة عدم ظهور النمو البكتيري يكون المستضد المحضر جاهزاً للاستعمال.

11. ولمعرفة استخدام المساعد المناعي تم تحضير المستضد السطحي للبكتريا و ذلك باستخدام حجم من التركيز المستضدي البكتيري المطلوب مع حجم مساو من المساعد المناعي كل على انفراد (Shnawa & AL-Shahery,2001).

b. تحضير المستضد السطحي للبكتريا الموجبة الكرام المقتولة بالبنزال كونيوم كلورايد.

- اعتمدت طريقة (McCoy & Kennedy,1960) مع اجراء بعض التحويلات:-
1. تم تحضير مزرعة نقية عمرها 24 ساعة للبكتريا الموجبة على الوسط الصلب.
 2. اضيف 6 مل من محلول الملح الفورماليني المعقم الى سطح الطبق الحاوي على المزرعة البكتيرية ثم جرف النمو باستعمال عروة ناقلة معقمة.
 3. جمع المغسول بشكل عالق و يجانس باستعمال جهاز المازج لمدة 3 دقائق.
 4. اخذ من هذا العالق 5 مل و نبذ مركزيا بسرعة 4000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
 5. ترك الرائق و غسل الراسب باضافة 5 مل من محلول الملح الطبيعي المعقم وينبذ مركزيا بعد مازجته بسرعة 3500 دورة/ دقيقة مدة 3 دقائق.
 6. تم رمي الرائق و علق الراسب باضافة 5 مل من محلول البنزال كونيوم كلورايد بتركيز (1000:1) ثم يمزج بجهاز المازج.
 7. اخذ من هذا العالق 1 مل و وضع في انبوبة جهاز قياس العتومة و اكمل الحجم باضافة كمية اخرى من محلول البنزال كونيوم كلورايد الى ان تصبح عتومة العالق مساوية لعتومة الانبوبة القياسية فيصبح التركيز النهائي 10 وحدات دولية.
 8. اجري فحص عقم المستحضر.

c. تحضير مستضد بروتينات الجدار الخارجي Outer Membrane Protein (OMP) لبكتريا *H. influenzae b*

- استخدمت طريقة (Carlone et al., 1986) و كما يلي:-
1. حضرت مزرعة نقية لبكتريا *H. influenzae b* على وسط اكار الجوكليت.
 2. بواسطة عروة ناقلة تم نقل 2-4 مستعمرات في انبوب يحوي 10 مل من نقيع الصلب و الدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth المعقم و المضاف اليه 5 مايكروليتر من الدم المسخن.
 3. حضن الانبوب بدرجة 37 م في جهاز الهزاز (Shaker) 100 دورة/ دقيقة لمدة 24-18 ساعة.
 4. اخذ 10 مل من العالق البكتيري و نبذ بسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة 4 م.

5. علق الراسب في 1.5 مل من محلول داري 10 HEPES عياري المبرد (N-2 Hydroxy Ethylpiperazine N₂- Ethanesulfonic Acid C₈H₁₈N₂O₄S) (الوزن الجزيئي 238.31) شركة Sigma.

6. نبذ عالق الخلايا بسرعة 18000 دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة بدرجة 4 م.

7. يؤخذ الراسب و يحفظ بالتبريد او يستخدم حالاً.

d. تحضير راشح خلاصة المزروع الحر من الخلايا بالترشيح الفوقي بالاغشية المرشحة الدقيقة Cell Free Culture.

1. جرى تنمية بكتريا *H. influenzae b* في وسط نقيع المخ و القلب Brain Heart Infusion Broth و نبذ مركزيا بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة.

2. رشح الرائق باستعمال وحدة الترشيح الفائق عبر Millipore Filter Paper.

3. وزع الرائق في قناني بلاستيكية معقمة و حفظ في الثلجة لحين الاستعمال (Shnawa & Thewaini, 2002).

e. تحضير مستضد المحفظة (الكبسولة)

حضر مستضد المحفظة حسب ما جاء في (Kwapinski,1972)

1. تزرع البكتريا على وسط اكار الجوكليت و تحضن بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة في ظروف توفير CO₂.

2. اضيف 6 مل من محلول الملح المعقم و تم جرف النمو من على سطح الطبق باستعمال عروة ناقلة معقمة باللهب.

3. مزج العالق البكتيري جيدا بوساطة استعمال جهاز المازج (Vortex) لمدة 2 دقيقة.

4. اضيف 1 مل من حامض HCl (0.5 عياري) لكل 10 مل من العالق البكتيري.

5. سخن العالق اعلاه في جهاز حمام مائي بدرجة 75 م لمدة 35 دقيقة.

6. برد ثم نبذ بجهاز المنبذ لمدة 3 دقائق.

7. اخذ الراشح و عدل الأس الهيدروجيني ليصبح 7 باستخدام 0.5 NaOH عياري.

8. اضيف استيت الصوديوم الايثيلي بمقدار ثلاثة اضعاف حجم العالق اعلاه.

9. ترك العالق في الثلجة لمدة يوم كامل بدرجة 4 م.

10. يلاحظ تكون راسب يؤخذ الراسب و يذوب في 1 مل ماء مقطر معقم ,يلاحظ تكون لون ضبابي .

11. تعاد الخطوة (8) اعلاه و يترك العالق لمدة ساعة ,بعدها ينبذ بسرعة 2500 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق.

12. ينقى الراسب باستخدام الكحول الايثيلي المطلق ثم يذوب في 1 مل من الماء المقطر المعقم .

13. جرى مقارنة العالق البكتيري مع جهاز قياس العتومة Opacimeter للحصول على التركيز المطلوب .

14. جرى فحص العقم على العالق المستضدي وذلك باخذ لقاحه بواسطة عروة ناقلة معقمة من هذا العالق وتخطيطها على وسط مغذي صلب, وضعت في الحاضنة بدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

2- الاختبارات المصلية

A. طرائق الفصل

1. فصل الامصال Separation Of Sera

بعد جمع الدم بالأنابيب المعقمة ينقل الى المختبر ثم تترك الأنابيب ليتخثر الدم بعدها توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 3000 دورة/ دقيقة ثم تم فصل المصل بواسطة انابيب باستور معقمة و توضع في انابيب حفظ العينات مع اضافة مادة ازاييد الصوديوم (Frei *et al.*, 1995).

2. فصل الكلوبوليونات المناعية الافرازية من عينة CSF بطريقة PEG:

.Separation of Secretary Ig(S.Ig) From CSF By PEG

1. اخذ 1 مل من عينة CSF في انبوبة اختبار و يضاف لها حجم متساو من من محلول الملح الفورماليني (0.5 %).
2. ينبذ المحلول في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة نصف ساعة.
3. يجمع الرائق و يترك الراسب، يؤخذ حجم من الرائق و اضيف اليه حجم مساوي من PEG بتركيز 6 % يترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة.
4. ينبذ المحلول لمدة نصف ساعة و بسرعة 3500 دورة/ دقيقة.
5. يترك الرائق و يؤخذ الراسب ثم يذوب في 1 مل من محلول الملح الوظيفي ثم يحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م (Shnawa and Al Saadi;2002).

B. اختبار التلازن بالانابيب Tube Agglutination Test

استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود او عدم وجود خاصية ضدية للكلوبوليونات المناعية الافرازية و المصلية لمستضدات البكتريا و تحديد العيار (Garvey *et al.* 1977);

1- اختبار التلازن بالانابيب في المصل

1. اخذت 8 انابيب زجاجية نظيفة و معقمة و اضيف اليها 0.9 مل من المحلول الملحي الفورماليني الى الانبوبة الاولى و اضافة 0.5 مل من هذا المحلول الى كل من الانابيب التالية.

2. اضيف 0.1 مل من المصل الى الانبوبة الاولى و مزجت محتويات الانبوبة جيدا.
3. اخذ 0.5 مل من الانبوبة الاولى الى الانبوبة الثانية و مزجت محتويات الانبوبة جيدا ونقل منها 0.5 مل الى الانبوبة الثالثة و هكذا الى الانبوبة السابعة.
4. نقل 0.5 مل من الانبوبة السابعة الى الخارج ليصبح تسلسل التخفيف 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640.
5. تم اضافة 0.5 مل من المستضد البكتيري المحضر بتخفيف 10 وحدات دولية الى الانابيب اعلاه.
6. مزجت الانابيب جيدا و جرى حضانها بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة و بعد ذلك لوحظت النتيجة (وجود او عدم وجود تلازن) بظهور لزائن متكتلة في قعر الانبوبة و اذا حركت الانبوبة حركة خفيفة ادت الى تطاير هذه اللزائن بشكل ندف مع بقاء الانبوب راقا فان هذا يدل على ايجابية الاختبار اما اذا تطاير الراسب بشكل متجانس مسببا عكورة و ضبابية للانبوب المفحوص فان هذا يدل على عدم وجود تفاعل ضدي ملزن للمستضدات بعدها تم تسجيل اخر تخفيف اظهر تفاعلا ايجابيا أي العيار Titer.
7. الأنبوبة رقم 8 تمثل السيطرة السالبة و محتويات هذا الانبوب المحلول الملحي الفورماليني 0.5 مل و 0.5 مل من المستضد البكتيري المخفف (Garvey et al. ;1977).

2- اختبار التلازن بالانابيب للكلوبيولينات المناعية الافرازية

1. تم اخذ 8 انابيب نظيفة و معقمة و اضيف اليها 0.2 مل من الملح الفورماليني.
2. اضيف 0.2 مل من عالق الاضداد CSF الى الانبوبة الاولى و تم مزج محتوياتها جيدا.
3. نقل 0.2 مل من محتويات الانبوبة الاولى الى الانبوبة الثانية و من الثانية الى الثالثة وهكذا الى السابعة.
4. نقل 0.2 مل من محتويات الانبوبة السابعة الى الخارج و اصبح تسلسل التخفيف 1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64.
5. تم اضافة 0.2 مل من عالق مستضد البكتريا الى الانابيب كلها المذكورة اعلاه.
6. مزجت الانابيب جيدا و جرى حضانها بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة بعدها سجلت النتيجة.
7. الانبوبة رقم 8 تمثل سيطرة سالبة و محتويات هذه الانبوبة محلول الملح الفورماليني 0.2 مل و 0.2 مل من المستضد البكتيري (Shnawa and Al Saadi ;2002).

3- اختبار اختزال الاضداد الافرازية و الاضداد الجهازية Reduction Test of S.Ig and Circulating Ig

في الوقت نفسه الذي تم فيه اختبار الاناييب تم استخدام 8 اناييب اخرى للاضداد المصلية و 8 للاضداد الموضعية CSF و تم اجراء الخطوات نفسها في اختبار الاناييب ولكن استبدل المحلول الملحي الفورماليني بالمحلول المختزل ثاني مركبتو اثنول 2ME 0.05 مولاري و المخفف بالمحلول الملحي. ان بقاء التفاعل موجبا بالعيار نفسه يعني عدم تأثر الاضداد الموضعية و الاضداد المصلية بالعامل المختزل. و خلاف ذلك يعني تأثر الاضداد بالعامل المختزل وفقدانها الفعالية الضدية (Cruickshank *et al.*, 1975).

تم اجراء فحص التلازن لجميع المستضدات المحضرة مع المصل ومستخلص CSF للمرضى، و كان للبكتريا *H. influenzae b* خصوصية في تحضير مستضد بروتينات الغلاف الخارجي و المحفظة و راسح الخلايا الحر و اجراء فحص التلازن مع جميع هذه المستضدات و استكمال الدراسة على هذه البكتريا.

4- قياس تركيز الكلوبوليونات الافرازية في مستخلص CSF و تركيز البروتين الكلي للمصل

استخدمت طريقة البايوريت لقياس تركيز البروتين الكلي في المصل (Bishope *et al.*, 1985).

1. وضع 5 مل من محلول البايوريت في انبوبة خاصة بجهاز الكثافة الضوئية.
2. اضيف حجم 0.1 مل من المصل الى الانبوبة المذكورة و تمثل انبوبة الفحص Test Tube.
3. اضيف حجم 0.1 مل من الماء المقطر الى انبوبة اخرى تحوي 5 مل من محلول البايوريت.
4. تخلط الاناييب جيدا و تترك في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ثم تقرأ الكثافة الضوئية لانبوبة الفحص بعد تصفير الجهاز بانبوبة السيطرة عند طول موجي 540 نانوميتر.

و في قياس تركيز الكلوبوليونات الافرازية استخدمت طريقة (Shnawa & Al-Saadi, 2002) كما يلي :-

1. وضع 4.9 مل من محلول البايوريت في انبوبة خاصة بجهاز الكثافة الضوئية.
2. اضيف 0.2 مل من عالق الكلوبوليونات الافرازية CSF الى الانبوبة المذكورة و اضيف 0.2 مل من الماء المقطر الى انبوبة اخرى.
3. تقرأ الكثافة الضوئية لانبوبة الفحص على طول موجي 540 نانوميتر بعد تصفير الجهاز باستخدام انبوبة السيطرة.

و من المنحني القياسي Standard Curve المحضر من تخافيف الألبومين القياسية و قراءة الكثافة الضوئية لهذه التراكيز المتوالية حسب الطريقة أعلاه تم استخراج معادلة منحني القياس :

$$\hat{Y} = a + bx$$

ومن استخراج هذه المعادلة تم قياس تركيز البروتين الكلي المصلي و تركيز الكلوبوليونات الإفرازية.

5- دراسة المنحني القياسي لتركيز البروتين.

في تجربة لبناء المنحني القياسي لتقدير تركيز البروتين استعمل بروتين قياسي هو الألبومين البقري بتركيز 60 غم/ لتر و حضرت سلسلة تخافيف منه و جرى تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف بطريقة تفاعل بايوريت و لخمس مكررات و باستعمال تحليل الانحدار الخطي البسيط احتسبت القيمة المقدرة للتركيز و حددت معادلة الخط المستقيم البسيطة و كانت معادلة من الدرجة الأولى للعلاقة بين قيمة الكثافة الضوئية المطيافية (Xi) و التركيز (Yi) (Dawed & AL-Yas, 1990) و قد استعمل محلول البايوريت لتوفر مواده الأولية و عدم الحاجة فيها إلى أجهزة معقدة علما انه تمت القراءة بطول موجي 540 نانوميتر الجدول (2) الشكل (2):

$$\hat{Y} = a + bx$$

\hat{Y} : تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسي لتقدير كمية البروتين الكلي و تقدير كمية الكلوبولين المناعي الإفرازي.

a: تمثل الفرق بين متوسط التركيز و بين حاصل ضرب معامل الانحدار b في متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي.

$$a = Y - bx$$

$$b = \frac{\sum xy - \left(\sum x \frac{\sum y}{n} \right)}{\sum x^2 - \left[\frac{(\sum x)^2}{n} \right]} = \frac{19.427925}{0.114971}$$

$$b = 168.9$$

$$\bar{a} = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$\bar{a} = 11.9881 - 12.6675 = -0.67$$

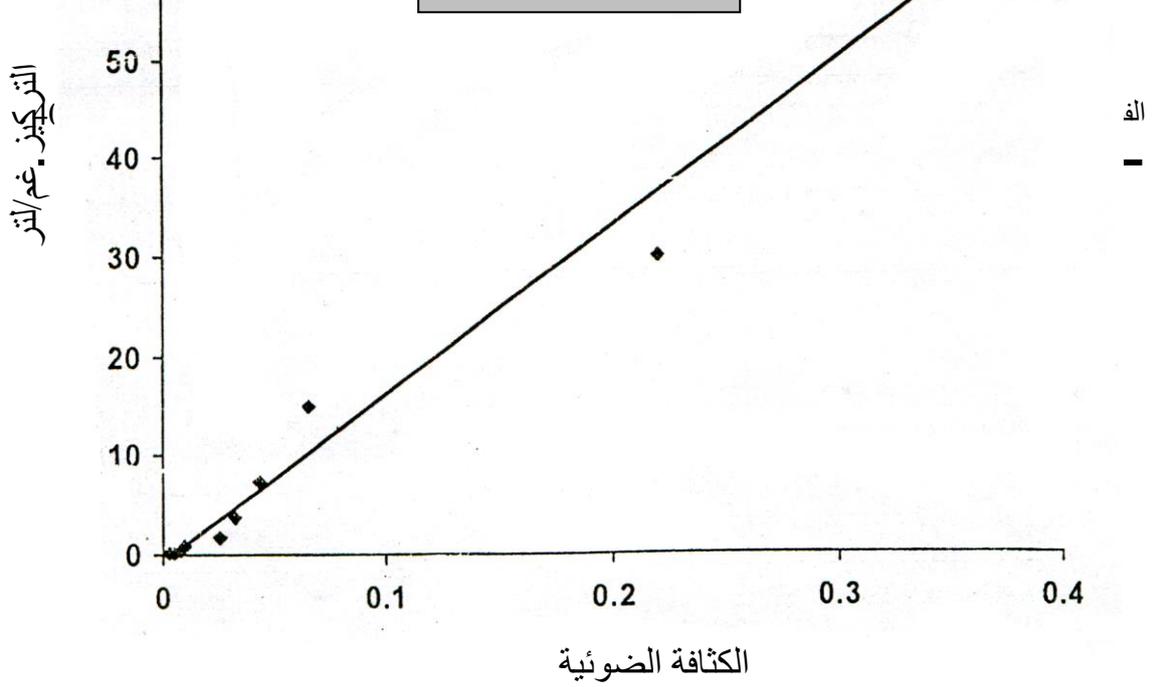
$$\hat{y} = a + bx$$

$$\hat{y} = -0.67 + 168.9xi$$

$$r = \frac{\sum xy - \left(\sum x \frac{\sum y}{n} \right)}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \left[\frac{(\sum x)^2}{n} \right] \right] \left[\sum y^2 - \left[\frac{(\sum y)^2}{n} \right] \right]}}$$

$$r = \frac{19.427925}{\sqrt{(0.114971)(3362.8442)}} = \frac{19.427925}{386.62956}$$

$$r = 0.988$$



شكل (2): المنحنى القياسي (Standard Curve) لتراكيز محاليل الالبومين القياسي و الكثافة الضوئية

الجدول (2) : البيانات و المعالم الاحصائية بمعادلة المنحنى القياسي لتركيز محلول الالبومين و تخافيفه القياسية (غم/لتر)

X_i	Y_i	$X_i Y_i$	X^2	Y^2
0.339	60	20.34	0.1149	3600
0.22	30	6.6	0.0484	900
0.065	15	0.975	0.004225	225
0.043	7.5	0.3225	0.001849	56.25
0.032	3.75	0.12	0.001024	14.06
0.025	1.875	0.046875	0.000625	3.516
0.01	0.937	0.00937	0.0001	0.877
0.008	0.468	0.003744	0.000064	0.219
0.005	0.234	0.00117	0.000025	0.0547
0.003	0.117	0.00035	0.000009	0.0136
0.75	119.881	28.419	0.171221	4799.9896

6- اختبار التلازن الدموي غير المباشر (المنفعل) Passive Haemagglutination

جرى هذا الاختبار حسب طريقة (Boyden, 1951) و كما يلي:-

1. جمعت نماذج الدم من الخراف في انابيب زجاجية نظيفة و معقمة و تحتوي على كمية مساوية من محلول السيفر.
2. حفظت الانابيب اعلاه في الثلجة بدرجة 4 م لحين الاستعمال.
3. اخذ 3 مل من الدم اعلاه الى انبوبة نبذ مركزي و اضيف اليها 10 مل من محلول الملح الطبيعي.
4. مزجت جيدا ثم نبذت بسرعة 2500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، ازيل الراشح بوساطة انبوية باستور معقمة.
5. غسل راسب كريات الدم الحمر بوساطة المحلول الملحي الطبيعي ثلاث مرات.
6. اضيف 10 مل من محلول الملح الطبيعي المعقم و اخذ 3 مل من عالق الخلايا و تم اضافة 3 مل من حامض التانيك إلى 3 مل من عالق كريات الدم الحمر و ترك في حمام مائي بدرجة 37 م لمدة 10 دقائق.
7. ينبذ المحلول لمدة 5 دقائق بسرعة 2500 دورة/ دقيقة، يزال الرائق و يغسل الراسب ثلاث مرات بمحلول الملح الطبيعي.
8. يعلق الراسب إلى 3 مل.
9. يؤخذ 1 مل من المستضد و 1 مل من العالق أعلاه مع إضافة 2 مل من محلول المحلول الطبيعي (راشح الخلايا الحر)، يترك 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
10. ينبذ مركزيا لمدة 5 دقائق بسرعة 2500 دورة/ دقيقة، ثم يغسل ثلاث مرات.
11. يعلق الراسب 1 مل و يكون جاهز لعمل التخافيف.
12. تعمل التخافيف العشارية الثنائية للامصال و المستخلص الافرازي مع محلول الملح الطبيعي بمقدار حجم 0.1 مل محلول الملح الطبيعي و 0.1 مل للامصال او المستخلص الافرازي و يضاف مقدار 0.1 مل من معلق الراسب اعلاه (فقرة 11) بطريقة اطباق العيار الدقيق Microtitration Plates (Garvey et al., 1977).
13. تحضن الأطباق في الحاضنة بدرجة 37 م لمدة 45 دقيقة – 18 ساعة.
14. تقرأ النتيجة بملاحظة حلقة الترسيب في قاع الحفرة، اذ تعد الحلقة الكاملة القعر نتيجة سالبة و الحلقة المنتشرة نتيجة موجبة.

7. الانتشار المناعي القطري:- Radialimmunodifussion (RID)

A. تم تحديد الكلوبولينات المناعية IgA، IgM، IgG و المتمم C₃، C₄ الموجودة في مصل المريض المصاب بطريقة الانتشار المناعي الاشعاعي حسب مبدأ Mancini التي وصفت العلاقة الخطية بين تركيز المستضد و نصف قطر حلقة الترسيب المناعي التي تتكون في الاكار المحتوي على الاضداد النوعية لذلك المستضد باستخدام Immuno Plates المصنعة من قبل شركة Biomaghreb و يتكون كل طبق Plate من:-

1. 12 حفرة (اختبار) و هي موضوعة في اكياس المنيوم من نوع لا ينفذ منه الهواء.

2. كل طبق يتكون من خليط من الاكاروز المدرأ و المصل الضدي للكلوبيولين عند pH 7.2 مع 0.1 % ازايد الصوديوم.

تم اجراء طريقة العمل حسب تعليمات الشركة المصنفة كما يلي:-

1. تخرج العلب من الثلاجة و توضع في درجة حرارة الغرفة ثم تخرج الاطباق والمصل القياسي من هذه العلب.
2. ترفع اغطية الاطباق للتأكد من عدم وجود رطوبة و في حالة وجود رطوبة تترك الاطباق بدون غطاء في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ليتبخر الماء.
3. يخرج المصل القياسي و عينات السيطرة و عينات المرض في عبواتها و يؤخذ 5 مايكروليتر من المصل القياسي و من عينات السيطرة و المرضى و توضع في حفرها الملائمة.
4. يعاد الغطاء الى الاطباق و تحضن في درجة حرارة الغرفة (23 ± 2) او في حاضنة في درجة حرارة 30 م و توضع عند مستواها السطحي لمدة 1-3 ايام بعدها تلاحظ النتائج، فالنتيجة الموجبة تتمثل بظهور حلقة ترسيب حول الحفرة و النتيجة السالبة عدم تكون مثل هذه الحلقة. تقاس حلقة الترسيب بالمسطرة و يقارن القطر بجدول التراكيز المرفق من الشركة . اذ يمثل جدول التراكيز:- القطر D بالمسطرة بالملم (mm) والتراكيز ملغم/دل (mg/ dl)

B. التلازن الدموي غير المباشر العكسي Reverse Passive Agglutination

بعد تحميل مستضد بكتريا *H. influenzae b* في دم الحيوان المختبري الارنب كما سيتم ذكره لاحقا، اجري الفحص كما يلي:-

1. جمع الدم من الارنب و فصل المصل المحمل بمستضد بكتريا *H. influenzae b* و تم تحميله على كريات الدم الحمر للخراف كما سيرد لاحقا فقرة (5-11-3).
2. يوضع في جميع حفر Microtitration Plate حجم 0.1 مل من محلول الملح الطبيعي
3. يوضع في الحفرة الاولى 0.1 مل من مستخلص CSF المرضى.
4. ينقل 0.1 مل من الاولى الى الثانية وهكذا وصولا الى الحفرة الاخيرة يهمل العالق المنقول.
5. يضاف مستضد البكتريا المحضر من مصل الارنب بمقدار 0.1 مل لكل حفرة.
6. يترك مدة 45 دقيقة في الحاضنة بدرجة 37 م.
7. تقرأ النتيجة (Garvey et al. ; 1977)

3-14: الدراسة المناعية في الأرنب لمستضدات

H.influenzae b

1-الحيوان المختبري

تم شراء مجموعة من ذكور الأرانب المختبرية النيوزلندي الابيض بوزن 1.5-2 كغم للارنب الواحد. و جرى تكييفها لجو التجربة لاسبوع تحت الظروف القياسية للاكل و

الشرب و التأهيل. و اجري عليها قبل التجربة بعض الفحوص للتأكد من عدم وجود أي اصابة تجعل الحيوان خارج التجربة (Schneider *et al.*, 1990).

2- تحضير المستضدات

تم تحضير مستضد المحفظة كما ورد في الفقرة (3-13-e) و مستضد بروتينات الجدار الخارجي كما ورد في الفقرة (3-13-c) و مستضد راشح الخلايا الحر كما ورد في الفقرة (d).

3- المساعدات المناعية

تم استخدام المساعد المناعي Complete Freund Adjuvant (BioMerux) Difco.USA

4- برنامج التمنيع

تم حقن ارنبان لكل مستضد من مستضدات المحفظة و بروتين الغلاف الخارجي OMP لبكتريا *H. influenzae b* إضافة إلى المساعد المناعي (AL- Shahery&Shnawa,1989; Shnawa &Thewaini,2001) مع ترك حيوان دون حقن كسيطرة حسب الجدول (3) :-

الجدول (3): طريقة التمنيع في الحيوان المختبري

موقع الحقن		الحجم	التركيز	المدة
يسار	يمين			
0.25 في العضلة	0.25 في العضلة Intramuscular	1 مل	المستضد 10 وحدات دولية	الأسبوع الأول
	0.25 تحت الجلد Subcutaneous			
	0.25 تحت الرقبة Subcalvian			
توزع في مناطق مختلفة		1 مل	المساعد المناعي	
0.25 في العضلة	0.25 في العضلة	1 مل	المستضد 10 وحدات دولية	الأسبوع الثالث
	0.25 تحت الجلد			
	0.25 تحت الرقبة			
توزع في مناطق مختلفة		0.5	المساعد المناعي	

الاسبوع الخامس:- شرحت الحيوانات بعد تخديرها بثاني اثيل الايثر و اخذ منها الدم من القلب مباشرة و وضع في انابيب بدون مانع للتجلط للحصول على المصل و انابيب ذات مانع للتجلط للحصول على راسب الخلايا البيض. كذلك تم اخذ الزائدة الدودية Appendix و الاثني عشر Duodenum و وضع في طبق بتري حاوي على محلول الملح الفورماليني لغرض فصل الكلوبولينات الافرازية من تلك العينات ,تم قياس تركيز الكلوبولين المناعي للمصل و المواد الافرازية بطريقة البايوريت و اجراء اختبار التلازن بالانابيب و اختبار الهجرة للخلايا البيض LIF كذلك اجراء اختبار التلازن الدموي المباشر.

5- الاختبارات المناعية

a. استخلاص البروتين الافرازي من الزائدة الدودية Appendix و الاثني عشر Duodenum

استخدمت طريقة (Shnawa & Abid,2005) في استخلاص البروتين الإفرازي:

1. تؤخذ الاعضاء اعلاه و توضع في اطباق بلاستيكية نظيفة تحتوي على محلول الملح الفورماليني و تفتح باستخدام مقص نظيف طويلا.
2. تنظف محتوياتها بالغسل بمحلول الملح الطبيعي.
3. يؤخذ 10 مل من محلول الملح الفورماليني و تجرف الطبقة المخاطية Mucosal ثم يعمل عالق.
4. ينبذ في جهاز المنبذه لمدة نصف ساعة بسرعة 3500 دورة/ دقيقة.
5. يؤخذ الرائق و يضاف اليه حجم مساو من مادة PEG بتركيز 6 %.
6. يترك فترة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
7. تم اجراء النبذ المركزي لمدة نصف ساعة بسرعة 3500 دورة/ دقيقة.
8. يهمل الرائق و يذوب الراسب في 1 مل من محلول الملح الفورماليني يمثل خلاصة الكلوبولين المناعي الإفرازي.

b. قياس تركيز البروتين الكلي و الافرازي:-

1. جرى قياس تركيز البروتين الكلي للمصل المفصول من الحيوان المحقون بمستضد المحفظة و OMP بطريقة البايوريت الواردة سابقا و كذلك لحيوان السيطرة.
2. يقاس تركيز البروتين الافرازي لمستخلص الاعضاء (الزائدة الدودية، الاثني عشر) بعد تنظيفها بطريقة البايوريت ايضاً.

c. اختبار التلازن بالانابيب

جرى اختبار التلازن بالانابيب للمصل المفصول من الحيوان المحقون بمستضد المحفظة و مع مستضد المحفظة و OMP المحضر مختبريا كما في الطريقة الواردة سابقا (b-13-3-) مع 2ME و بدونه و كذلك اجري الاختبار للمواد الافرازية المفصولة من الزائدة الدودية و الاثني عشر من الحيوان المحقون لتحديد عيار الضد المتخصص بالمستضد و ذلك باستعمال التخافيف العشارية و الثنائية المتسلسلة.

كذلك اجريت تغطية كريات الدم الحمر للخرفا بمستضد المحفظة او OMP المحمل على مصل الحيوان المفصول باستخدام حامض التانيك. كما في الفقرة (3-13-6). ومعايرة هذه الخلايا الحمر المغطاة بالمستضد مع تخافيف الأضداد الجهازية (المصل) ومحلول الاضداد الافرازية (المخاطية) بطريقة اطاق العيار الدقيق (Garvey et al., 1977) Microtitration Plates.

d. فصل الخلايا البيضاء من الزائدة الدودية و الاثني عشر

1. يؤخذ الراسب المتكون في الفقرة (5) اعلاه و يضاف اليه حجم مساو من الكستران % 3.
2. يترك مدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
3. يؤخذ الرائق و يندب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
4. يذوب الراسب في 1 مل من محلول الملح الطبيعي.
5. تملأ أنابيب شعرية بالمحلول اعلاه (فقرة 5) و تنبذ بجهاز HaematocriteH. Microcentrifuge لمدة 10 دقائق للحصول على راسب المواد الافرازية.
6. توضع الأنابيب الشعرية في حفر الاكار A لقياس عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض (Skoog and Beck; 1956).

e. اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض Leucocytes Inhibition Factor (LIF)

- استخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في الدم و المواد الافرازية للحيوان مع مستضدات بكتريا *H. influenzae b* المحضرة للمحفظة و OMP و راشح الخلايا (Soberg, 1969) كما يأتي:-
1. يحضر وسط Agar-A في اطاق بلاستيكية معقمة و عمل حفر بقطر 2 سم على طبقة الاكار A.
 2. توضع في كل حفرة انبوبة شعرية حاوية على راسب الدم او المواد الافرازية بعد ان يتم طردها مركزيا بجهاز Haemato Kit H..Microcentrifuge لمدة 10 دقائق.
 3. يضاف حجم 0.1 مل من محلول المستضد المحضر الى الحفر و 0.1 مل من محلول الملح الطبيعي المعقم (سيطرة).
 4. يضاف 0.1 مل من محلول Basal Medium Eagle الى الحفر و تحضن بدرجة حرارة 37 م داخل ناقوس زجاجي مع وضع قطعة مبللة لمدة 24 ساعة في الحاضنة.
 5. يتم قياس عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض بوساطة جهاز Oculometer .

معامل التثبيط =	قطر دائرة الهجرة مع المستضد
	قطر دائرة الهجرة بدون المستضد

علما ان النتيجة المعنوية تقع بين (30-70)%

f. اختبار الجلد Skin Test

تم حقن 0.25 مل من راشح مستخلص الخلايا تحت الجلد في الارنب و استخدم 2 حيوان للتجربة و ثالث للسيطرة لمعرفة تأثير مستضد البكتريا في الحساسية Sensitivity للارنب و مدى تأثر المناعة الخلوية للحيوان (Tompkins *et al.*, 1973)

3-15: التحليل الإحصائي

جرى دراسة جدوى الطرق العملية المتبعة في الدراسة من خلال استعمال اختبار Z للفرق بين نسبتين تحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ (Al- Rawi, 1980). وتم حساب Z من المعادلة الآتية:

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\hat{p}q \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

$$P_1 = \text{العينة الاولى}$$

$$P_2 = \text{العينة الثانية}$$

$$\hat{p} = \text{مجموع العينة الاولى والثانية.}$$

$$q = 100 - p$$

كما تم احتساب الحساسية المناعية التشخيصية والتخصص المناعي التشخيصي حسب ماجاء في (Stitis *et al.*, 1994 ; Stansfield, 1981).

الحساسية المناعية التشخيصية =	$\frac{\text{القيمة الموجبة الحقيقية}}{\text{القيمة الموجبة الحقيقية} + \text{القيمة السالبة الكاذبة}}$
-------------------------------	---

التخصص المناعي التشخيصي =	$\frac{\text{القيمة السالبة الحقيقية}}{\text{القيمة السالبة الحقيقية} + \text{القيمة الموجبة الكاذبة}}$
---------------------------	---

Chapter Four الفصل الرابع

Results النتائج

1-4: الصفات الفيزيائية والكيميائية للسائل المخي الشوكي

اظهرت عينات السائل المخي الشوكي (CSF) تبايناً في طبيعة اللون عند دراسة المظهر الخارجي فقد قسمت الى مجاميع كما موضح في الجدول (A-4)، شكل السائل المخي الشوكي الرائق نسبة 74.19% والسائل العكر نسبة 13.97% اضافة الى السائل الشوكي المائل للأصفرار نسبة 9.67% والسائل المشرب بلون الدم نسبة 2.15% من مجموع العينات الكلي 93. كما اظهرت نتائج الفحص الكيميائي الاولي لمستوى البروتين والسكر حسب الطريقة المتبعة في المستشفى (Randox Kit) ظهور مجموعتين من المرضى شكلت المجموعة الاولي المرضى ذات البروتين العالي والسكر الواطيء نسبة 75.2% بينما شكلت المجموعة الثانية المرضى ذات السكر العالي والبروتين الواطيء نسبة 24.7% من مجموع 93 عينة الذي ظهر فيها استجابة خلوية جدول (B- 4).

الجدول (4): الوصف الفيزيائي والكيميائي للسائل المخي الشوكي

A: الوصف الفيزيائي		
%	العدد:الكلي	الصفة
74.19	93:69	رائق Clear
13.97	93:13	عكر Turbid
9.67	93:9	مائل للأصفرار Xanthochromic
2.15	93:2	دموي Bloody
B: كيميائية السائل المخي الشوكي		
%	العدد:الكلي	الصفة
75.2	93:70	بروتين عالي سكر واطيء High Protein Low Sugar
24.7	93:23	سكر عالي بروتين واطيء High Sugar Low Protein
100	93:93	المجموع الكلي

2-4 الفحص البكتريولوجي للسائل المخي الشوكي والاختبارات المعززة الأخرى

1-2-4: الفحص المباشر: فحص السائل المخي المباشر

أثناء فحص عينات السائل المخي الشوكي بالتحضيرات المباشرة الرطبة تبين بان بعضاً منها اظهر استجابة خلوية التهابية مع وجود تراكم حية تشابه الكائنات المجهرية. وفي حالة التحضيرات المباشرة المصبوغة امكن دراسة طبيعة الخلايا المترشحة (ستذكر تفصيلاً عند دراسة الجزء المناعي) وفي حالات قليلة اظهرت اجسام بكتيرية.

2-2-4: الوصف المزري: وصف النمو على طبق الزرع الاولي

A: ذات الجدار

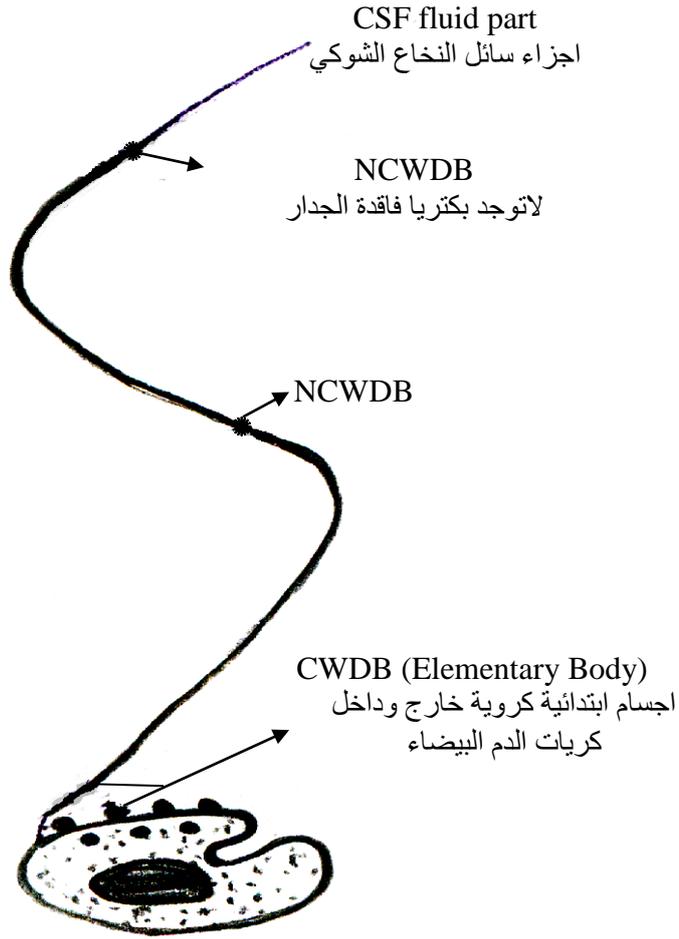
جرى مراقبة النمو الزرع على الاوساط الروتينية حتى 48 ساعة بدرجة 37 م° و كانت النتائج على الغالب تظهر نمو ضئيل من مستعمرات ذا مظاهر مختلفة وذو طبيعة توحى بانه احادي المسبب. بعض الحالات كانت سالبة على كل من اكار الدم والماكونكي والجوكليت.

B: فاقدة الجدار

تم متابعة النمو على الاوساط الروتينية والاطباق الخاصة بفاقدات الجدار مدة 3-7 ايام اخرى قبل ان تعد النتيجة سالبة. اذ لوحظ ظهور نمو ضئيل جداً من المستعمرات دقيقة Tiny او ذات مظهر البيض المقلي على وسط اكار الفاريننت خلال هذه الفترة لبعض اطباق الزرع السالب في المزارع التقليدية توحى بانه احادي المسبب.

C: تموضع فاقدة الجدار في مرض السحايا

تبين من تتبع تقنيات الزرع الخاص بفاقدة الجدار المطبقة في هذه الدراسة أن فاقدة الجدار اما داخل الخلية الالتهابية او على سطحها ولم تنجح المحاولات في رصده في السائل المخي الشوكي (الشكل 3).



الشكل: (3) تموضع البكتريا فاقدة الجدار CWDB في عينة السائل المخي الشوكي
(كرية دم بيضاء تلتصق على جدارها وفي داخلها اجسام ابتدائية)

3-2-4: الوصف المجهرى للمسبب المشارك النامي في المزرعة الثانوية

A: ذات الجدار

اختلفت الاشكال التي ظهرت من خلال الفحص المجهرى باختلاف المسبب المشارك بين اشكال سالبة لصبغة كرام عصويات قصيرة او طويلة ومكورات عصوية وبين اشكال موجبة لصبغة كرام كانت كروية مفردة او ثنائية ، سلاسل او تجمعات بعضها ذات براعم.

B: فاقدة الجدار

كانت الاشكال التي تظهر من خلال الفحص المجهرى بشكل اساسى كروية منتفخة احادية او متعددة بيضوية – بيضانية منتفخة وهناك تراكيب عصوية وكروية يظهر جزء منها منتفخ . الكروي المنتفخ يوحى لفاقد الجدار الكامل والمنتفخ جزئياً يوحى للفاقد الجزئي وكذلك الحال بالنسبة للعصويات

4-2-4: الوصف المزرعي للمسبب المشارك النامي في المزرعة الثانوية

A: ذات الجدار

تباينت اشكال المستعمرات النامية في المزرعة الثانوية النقية بتنوع المسبب المشارك كذلك اختلف لون المستعمرة وصفاتها الفيزيائية والرائحة . كانت بعض المستعمرات دائرية صغيرة محدبة او غير محدبة بعضها مضغوط او قرصي الشكل . اختلفت في تطلها للدم في اطباق اكار الدم بين محللة للدم وغير محللة. كما تبين بأن بعض المستعمرات شفافة وبعضها معتم. كما اختلفت المستعمرات في الحجم واللون والرائحة باختلاف الوسط الزرعى وفترة النمو وكانت معظم المستعمرات مخاطية.

B: فاقدة الجدار

اظهرت المزارع الثانوية مستعمرات نقية للبكتريا تميزت المستعمرات النامية على وسط اكار الفاريننت الصلب بشكل شبيه بمظهر البيض المقلي خصوصاً بعد صبغها بصبغة دينز في حالات، وفي حالات اخرى تميزت بكونها دقيقة Tiny، شفافة Translucent وتلمع عند سقوط الاشعة الضوئية المائلة عليها وتشبه مظهر الزجاج المقطوع، تمتاز ايضا بالطبيعة المرنة Squeezable وقابلة للانضغاط والمرور عبر هذه المرشحات الدقيقة .

4-2-5: التعرف الكيمياوي الحيوي للمسبب المشارك في المزرعة النقية

A: ذات الجدار

جرى التحري عن الخصائص الكيمياوية الحيوية للعزول النقية المستحصلة من حالات التهاب السحايا بطريقة الفحص التقليدي وباستخدام المصغرات EPI-20E ولكافة العزول اذ شمل الفعاليات الايضية والانزيمية والاختمارية. وتبين اختلافات في هذه الخصائص حسب تنوع المسبب (راجع الجزء الخاص بوصف المسببات المشاركة لاحقا 4-2-6) . وكانت نتائج المصغرات مناظرة للفحص التقليدي.

B: فاقدة الجدار

كانت البادئة اما من نمو في وسط الفارينت السائل او بشكل قالب يرفع من وسط الفارينت الصلب وينقل تحت الظروف المعقمة الى وسط الاختبار. لم تظهر عزول الفاقدة للجدار فروقات واضحة في الخصائص الكيمياوية الحيوية عن ذات الجدار ولنفس النوع.

4-2-6: وصف المسببات المشاركة

1- *Haemophilus influenzae b (Hib)*

اظهرت نتائج الفحص المجهرى بان هذه البكتريا ذات الجدار سالبة الصبغة، عصويات مكورة Coccobacilli، متعددة الأشكال في الزروع القديمة وغير مكونة للابواغ. واطهرت نتائج الفحص الزرعى بان هذه البكتريا ذات الجدار كونت مستعمرات دائرية صغيرة محدبة غير مرتفعة رمادية نوعاً ما على وسط اكار الجوكليت مخاطية نمت بشكل جيد بظروف 5% CO₂. أي انها مقلة في حاجتها للاوكسجين Microaerophilic. اما نتائج الفحص الكيموحيوي فقد اثبت بان هذه البكتريا كانت موجبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز واختزال النترات ونتاج حامض من تخمر الكلوكوز والزايلور اضافة الى كونها موجبة لاختبار التبعية والحاجة الى عاملي النمو x و v.

وكانت لفاقدات الجدار من هذا النوع اشكال خلوية متعددة اغلب الاحيان بشكل تجمعات كروية او عصوية منتفخة اقل حجماً مقارنة بذات الجدار. وتميز نموها الزرعى بشكل مستعمرات مخاطية دقيقة جداً على وسط اكار الفارينت. اما نتائج الفحص الكيموحيوي فلم تختلف عن البكتريا ذات الجدار

2- *Staphylococcus aureus*

بينت نتائج الفحص المجهرى بان المكورات العنقودية الذهبية ذات الجدار مكورات موجبة لصبغة كرام تتجمع بشكل منفرد او سلاسل قصيرة ذات عناقيد غير منتظمة وغير مكونة للابواغ واطهرت نتائج الفحص الزرعى بان ذات الجدار من هذه البكتريا كونت مستعمرات دائرية لماعة غير شفافة ذات لون اصفر ذهبي على وسط الاكار المغذي، انتجت مناطق محللة للدم نمط بيتا على وسط اكار الدم، مخمرة لسكر المانيتول على وسط اكار المانيتول الملحي، هوائية. اما نتائج الفحص الكيموحيوي فقد اثبتت بان هذه البكتريا ذات الجدار منتجة لانزيم الكاتاليز وانزيم التجلط وغير منتجة لانزيم الاوكسيديز غير متحركة وقدرتها على اختزال النترات. وبالنسبة لهذه البكتريا فاقدة الجدار فقد ظهرت بشكل منفرد وتجمعات بعضها منتفخة مع ظهور اجسام كروية كما ظهرت باشكال غير منتظمة في الفحص المجهرى واطهرت عدم وضوحية في حدود الالتقاء بين هذه الخلايا. اما من ناحية الخصائص المزرية كانت مستعمرات صغيرة دائرية لماعة غير شفافة على وسط اكار الفارينت. واکد الفحص الكيموحيوي عدم وجود اختلاف بينها وبين البكتريا ذات الجدار اذ كانت الفحوص الكيموحيوية متشابهة.

3- *Streptococcus pneumoniae*

اظهرت نتائج الفحص المجهرى لهذه البكتريا ذات الجدار بكونها موجبة الكرام كروية الشكل ، تترتب بشكل سلاسل قصيرة او طويلة وعلى الاغلب بشكل ازواج، غير مكونة للابواغ. واطهرت نتائج الفحص المزرعي بان ذات الجدار من هذه البكتريا كونت مستعمرات صغيرة دائرية تشبه الازرار مع مركز مضغوط او قرصية الشكل، محللة للدم حلاً جزئياً من نمط الفا. اما نتائج الفحص الكيموحيوي فاكدت انها سالبة لفحص الاوكسيديز وموجبة لكل من فحص الكاتاليز، واختبار ذوبان املاح الصفراء، وتخمر الانبولين وحساسيتها للاوبتوكين.

4- (*Group B Streptococcus*) : *Streptococcus agalactiae*

اظهرت نتائج الفحص المجهرى هذه البكتريا موجبة لصبغة الكرام مكورات مفردة او تترتب بشكل سلاسل قصيرة او طويلة، غير مكونة للابواغ. وظهرت مستعمرات ذات الجدار من هذه البكتريا بانها صغيرة على وسط اكار الدم مع منطقة تحلل كاملة. وكانت هذه البكتريا سالبة لفحص الاوكسيديز، سالبة لفحص الكاتاليز ومقاومة للمضاد الحيوي Bacitracin.

5- *Klebsiella pneumoniae*

كانت نتائج الفحص المجهرى لذات الجدار من هذه البكتريا بانها عصويات سالبة لصبغة الكرام وغير مكونة للابواغ وبينت نتائج الفحص الزرعي ان البكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي اذ كونت مستعمرات مخاطية دائرية محدبة ووردية غير محللة للدم على وسط اكار الدم، هوائية. اما نتائج الفحص الكيموحيوي فقد اكدت ان البكتريا منتجة لانزيم الكاتاليز وانزيم اليوريز وغير منتجة لانزيم الاوكسيديز سالبة لفحص المثيل الاحمر وموجبة لفحص الفوكس بروسكور و السترات و سالبة للاندول وانتاج غاز H₂S.

6- *Listeria monocytogenes*

يظهر الوصف المزرعي لهذه البكتريا ذات الجدار بان مستعمراتها على وسط اكار الدم دائرية صغيرة جداً ، ملساء شفافة ذات لمعان ثم تصبح معتمة مع منطقة تحلل دموي كامل. واعطت مستعمرات سوداء على وسط اكار الاسكولين، اختيارية التهوية. اما مستعمراتها على وسط اكار الفاريننت بكونها صغيرة شفافة لماعة تعطي مظهر الزجاج المكسور .

واكد الفحص الكيموحيوي بان هذه البكتريا غير منتجة للاوكسيديز والاندول واليوريز، موجبة لفحص الكاتاليز والمثيل الاحمر والفوكس بروسكور، غير منتجة لغاز H₂S, متباينة في تخميرها للسكريات.

اما بالنسبة لهذه البكتريا فاقدة الجدار اظهر الفحص المجهرى تجمعات عصوية منتفخة مختلفة الاشكال خيطية قصيرة متنوعة وطويلة غير منتظمة و منتفخة. ولم تختلف نتائج الفحص الكيموحيوي عن ذات الجدار. ويبين الجدول (1) في طرائق العمل نتائج الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا بالتفصيل

7-الخمائر *Candida SP.*

برزت الخمائر بوصفها مسببا في خمج السحايا وأظهرت نتائج الفحص المجهرى بكونها موجبة لصبغة كرام، كرويات منفردة او متجمعة، بشكل سلاسل قصيرة او طويلة، متبرعمة. واطهرت في الفحص الزرعى مستعمرات كبيرة نوعاً ما ملساء ، حليبية بيضوية او دائرية اعطت رائحة التخمر. واطهرت نتائج الفحص المجهرى للخمائر فاقدة الجدار بسيادة التجمعات الكروية وغير المنتظمة والأشكال المفردة والمتبرعمة. وكانت مستعمراتها على وسط الفارينت اقل حجماً وذات صفات ورائحة مشابه لذات الجدار.

4-2-7: تنوع المسببات المشاركة مع خمج السحايا

A: ذات الجدار

اظهرت نتائج زرع السائل المخي الشوكي للمرضى بالسحايا تنوعاً واضحاً في المسببات المشاركة من ذات الجدار وكما ياتي بكتريا *H.influenzae b* نسبة 4%، بكتريا *S.pneumoniae* و *S.agalactiae* 6% ، بكتريا *K.pneumoniae* و *S. aureus* نسبة 2% وكان للخمائر دور في حدوث المرض بنسبة 2% كما موضح في الجدول (5).

B: فاقدة الجدار

شاركت البكتريا فاقدة الجدار بحدوث خمج السحايا وتنوعت المسببات المرضية فقد شكلت بكتريا *H.influenzae b* نسبة 4% وبكتريا *S. aureus* نسبة 4% تلتها *L.monocytogenes* بنسبة 2% واخيرا الخمائر شكلت نسبة 2% كما موضح في الجدول (5).

الجدول (5): المسببات المشاركة مع خمج السحايا في المرضى

المسبب المشارك	ذات الجدار عدد المرضى الموجب: الكلى (%)	فاقدة الجدار عدد المرضى الموجب: الكلى (%)
<i>H.influenzae b</i>	(4) 50:2	(4) 50:2
<i>S.aureus</i>	(2) 50:1	(4) 50:2
<i>S.pneumoniae</i>	(6) 50:3	-
<i>S.agalactiae</i>	(6) 50:3	-
<i>K.pneumoniae</i>	(2) 50:1	-
<i>L.monocytogenes</i>	-	(2) 50:1
<i>Candida SP.</i>	(2) 50:1	(2) 50:1
المجموع الكلى	(22) 50:11	(12) 50:6

4-2-8: اختيار المسبب المشارك ذو السيادة الامراضية في المناعة

نظراً لسيادة بكتريا *H.influenzae b* في احداث خمج السحايا لدى الاطفال وظهورها في الاخماج المتسببة عن البكتريا ذات الجدار والبكتريا فاقدة الجدار بنسب عالية نسبياً مقارنة بالمسببات الاخرى فقد تم اختيار بكتريا *H.influenzae b* لدراسة الاستجابة المناعية لدى المرضى ودراسة الامراضية والمناعة في الحيوان المختبري .

4-2-9: امراض البكتريا الاكثر تواتراً في خمج السحايا في الفأر الابيض بالحقن عبر القحف

في تجربة لدراسة امراضية البكتريا الاكثر شيوعاً في خمج السحايا تم حقن كميات مختلفة التركيز من العالق البكتيري *H.influenzae b* في حيوان الفأر الابيض وفي مواضع مختلفة كما يظهرها الجدول (6).

فعند حقن 0.1 مل من عالق بكتيري يكافئ 10 وحدة دولية/ مل من بكتريا *H.influenzae b* ذات جدار وفاقدة جدار في القحف سببت في الحالتين موت مفاجيء للحيوان الفأر الابيض وعند حقن نفس الجرعة عبر الوريد في الوريد الذنب للفأر الابيض لم يحدث الوفاة وانما ادى الى بطأ في حركة الحيوان في لحظات ما بعد الحقن والملاحظة جارية لتثبيت حصول اعراض عصبية ام لا. اختفت الاعراض العصبية بعد 24 ساعة من الحقن وهذا يعني ربما حصول حالة الازمان Chronic او حمل المرض Carrier .

عند حقن 0.1 مل من عالق بكتيري يكافئ 1 وحدة دولية / مل من بكتريا *H.influenzae b* فاقدة الجدار ادى الى حصول غيبوبة ثم ارتجاف استمر حوالي 5 دقائق ثم خمول واضح في حركة الحيوان مع اضطجاع على جانب الرأس الذي حقنت فيه الجرعة كما يلاحظ في الشكل (C,B,A-4) مقارنة بحيوان السيطرة كما في الشكل (C-4). استمرت هذه الاعراض لساعة بعد الحقن ولا تزال الاعراض متابطة. وعند حقن نفس الجرعة من ذات الجدار ادى ذلك الى خمول في الحيوان ولم تحصل الاعراض العصبية الاخرى واستمرت المتابعة جارية لدراسة الاعراض العصبية واختفت الاعراض بعد 24 ساعة من الحقن. بعد متابعة ومراقبة الحيوان استسلم للموت في اليوم السابع في حالة فاقد الجدار واليوم العاشر في حالة ذات الجدار من الحقن فتم تشريحه وعمل مسحة مباشرة من الدماغ صبغت بصبغة كرام. شوهدت البكتريا منتشرة والخلايا البيض باعداد كبيرة (الشكل 5) ، اخذ الدماغ وتم تثبيته وعمل المقاطع النسيجية التي اظهرت حدوث التهاب الاغشية السحائي الحاد والاعداد الكبيرة من خلايا الدم البيض التقريفي الشكل (6). ويظهر الجدول (7) صورة تفصيلية لامراضية بكتريا *H.influenzae b* في حيوان الفأر الابيض.

الجدول (6): نتائج تجربة الامراضية لبكتريا *H.influenzae b* في حيوان الفأر الابيض

الجرعة من عالق	في القحف	في الوريد
----------------	----------	-----------

فأر 4	فأر 3	فأر 2	فأر 1	البكتريا بالوحدة الدولية
لم تجرى	لم تجرى	موت آني	موت آني	0.1 مل من تركيز 10 وحدة دولية لبكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار
أحياء	أحياء	وفاة بعد 7 ايام	اعراض عصبية	0.1 مل من تركيز 1 وحدة دولية لبكتريا فاقدة الجدار
احياء	احياء	وفاة بعد 10 ايام	خمول	0.1 مل من تركيز 1 وحدة دولية لبكتريا ذات الجدار



B



A

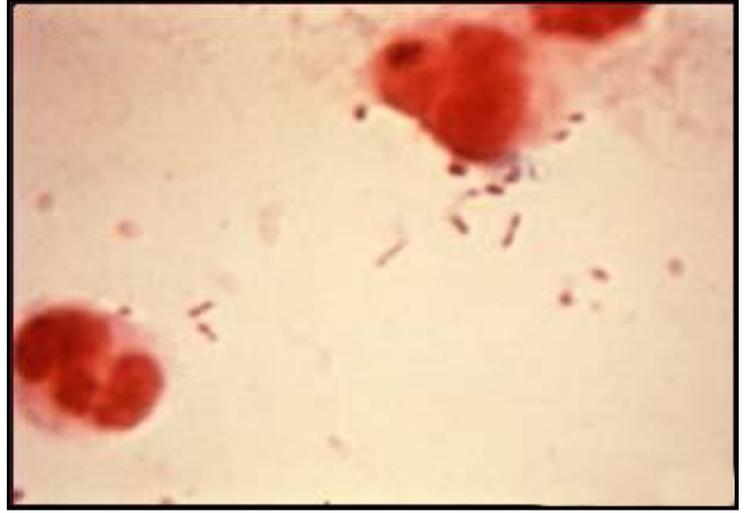


D

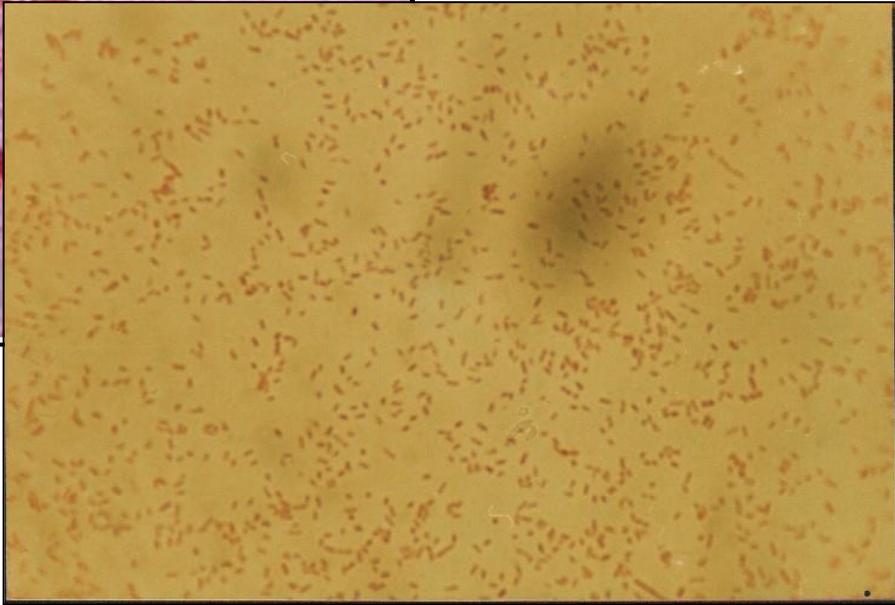
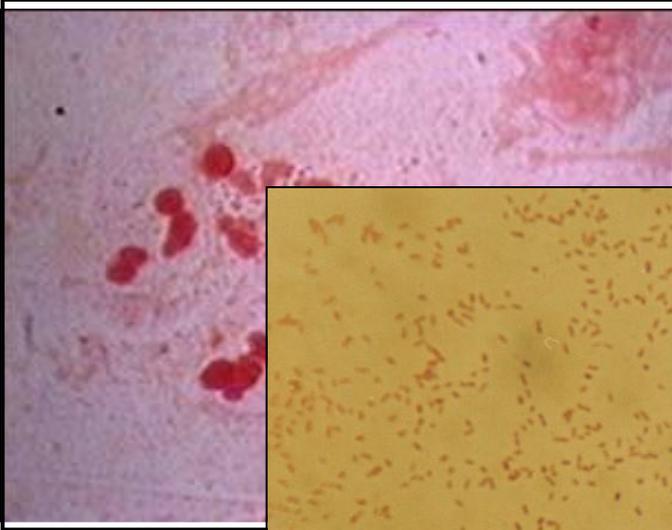


C

- الشكل (4) : علامات التهاب السحايا في الحيوان المختبري (الفأر الأبيض)
A : أرتجاف الحيوان .
B : الخمول .
C : ميل الحيوان على جانب الأصابة .
D : السيطرة .



A

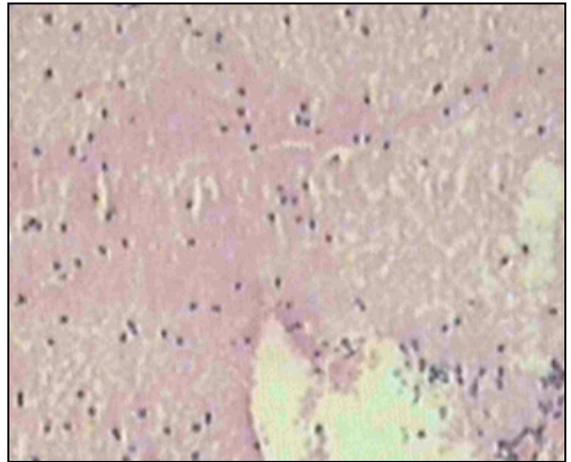
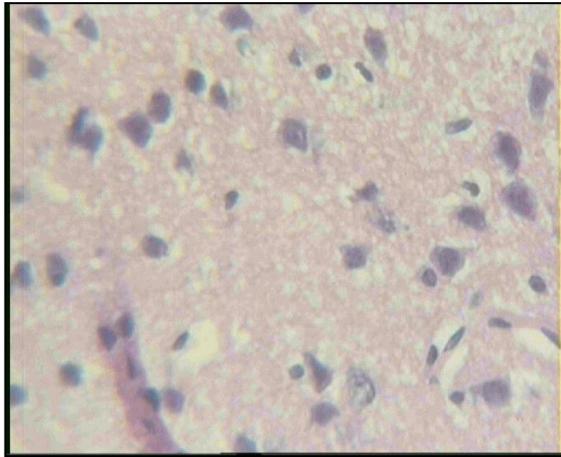
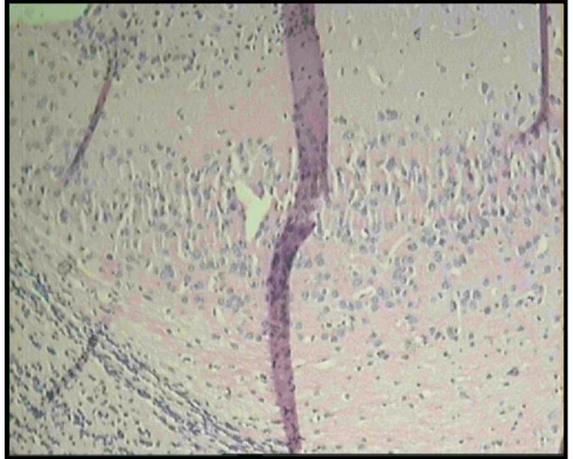
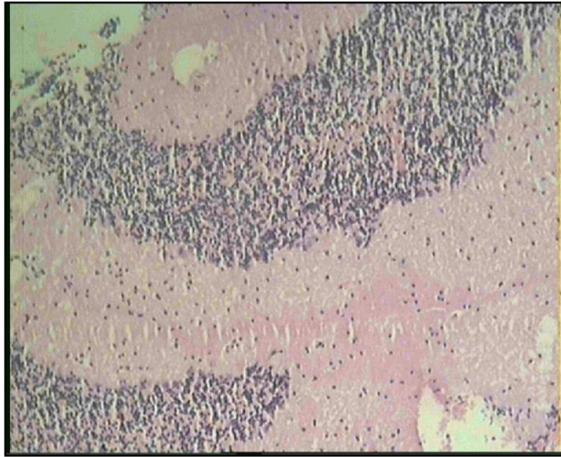
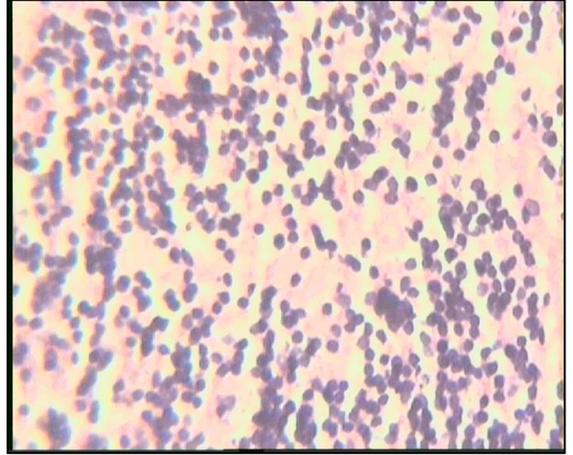
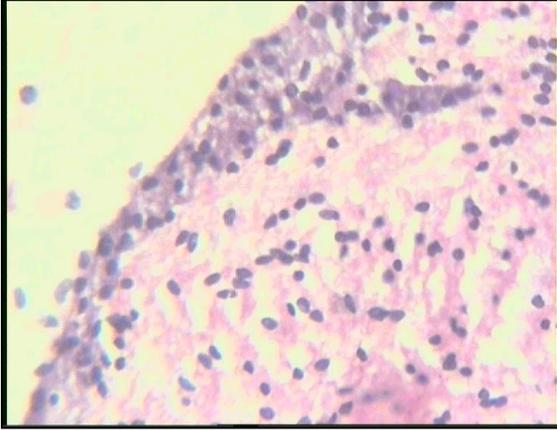


B

الشكل (5) : مسحة مصبوغة لبكتريا *H. influenzae b*

A : سائل الدماغ بتكبير X 1000 و X 1500

B: مزرعة نقية X 1000



الشكل (6) : مقطع نسيجي في دماغ الفأر يمثل :

A ، B ، C ، D: مصاب ببيكتريا *H. influenzae b* يتميز بأرتشاح اعداد من

الخلايا البيض. بتكبير (60 ، 600) X

F,E : السيطرة قوة التكبير (150 ، 1500)

الجدول (7): امراض البكتريا الاكثر تواتراً في خمج السحايا في الفأر الابيض عبر القحف.

الملاح	الوصف
1. الاعراض	ظهر على الحيوان مظاهر الغيبوبة وربما يعطي صورة النفوق وبعدها بـ5 دقائق بدأ الحيوان بالارتجاج كلياً واسبل رجليه الخلفيتين وثقلت حركته ويلاحظ ان الجهة التي حقن فيها يميل نحوها بشلل واضح ، اذ يعطي هذه العلامات صورة مشابهة لعلامات التهاب الاغشية الدماغية في البشر الشكل (4).
2.الصفة التشريحية	استخراج الدماغ بعد قطع القحف.
3. العينة من الاغشية الدماغية بعد قطع القحف	مسحة مباشرة للسائل المحيط بالاغشية الدماغية صبغت بصبغة كرام.
4. الفحص المباشر	ملاحظة البكتريا باشكالها المختلفة ، مكورات عصوية، خيطية، اشكال مختلفة ذات صبغة سالبة الكرام كما في الشكل (A-5). وملاحظة انواع خلايا الدم البيض المهاجرة الى الدماغ نتيجة الاصابة من خلايا عدلة متعددة اشكال النوى، او خلايا لمفية احادية الانوية مقارنة بالمزرعة النقية للبكتريا الشكل (B-5)
5. العرض النسيجي المرضي	المقاطع النسيجية تظهر التهاب في الاغشية السحائية مع ملاحظة انتشار الخلايا احادية النواة Lymphocyte بشكل كبير اضافة الى وجود الخلايا العدلة Neutrophil اذ تشير المقاطع الى حالة التهاب سحائي حاد ويوضح الشكل (6) مدى تأثر اغشية الدماغ بالاصابة

4-2-10 الجدوى العملية للطرق الزرعية المختلفة في تشخيص السحايا في الإنسان

استخدمت طرق متعددة في تشخيص مرض السحايا في الانسان منها الطريقة الروتينية في زرع عينة السائل المخي الشوكي في الاوساط الزرعية التقليدية وطريقة زرع العينة بمزارع الفارينت اضافة لزرع خلاصة السائل المخي الشوكي وراسب السائل المخي الشوكي بعد التكمير في مزارع الفارينت (الشكل (1) – طرائق العمل) فقد وجد ان الطريقة التقليدية اعطت نسبة 64.7 % واعطت طريقة زرع السائل المخي الشوكي بمزارع الفارينت نسبة 17.64% وطريقة زرع رسابة السائل المخي الشوكي بمزارع

الفارينت اعطى نسبة 5.88% اما طريقة زرع رسابة السائل المخي الشوكي بعد التكسير فقد اعطت نسبة 11.76%. وبهذا تشكل مجموع طرق فاقدة الجدار نسبة 35.2% الجدول (8). ومن هذا يتبين ان الطريقة التقليدية لم تعطي نتيجة فحص موجب لجميع عينات السائل المخي الشوكي اذ لا بد من استخدام طرق اخرى منها طريقة الزرع بمزارع الفارينت للتأكد من العامل المسبب، اذ قد يكون بكتريا فاقدة الجدار نتيجة تناول المضادات الحيوية او متخفية في الخلايا البيض وربما يكون المسبب غير بكتيري

جدول (8): الجدوى العملية للطرق الزراعية المختلفة في تشخيص السحايا في الانسان

نسبة الموجب		الطريقة
%	العدد الموجب :الموجب الكلي	
64.7	17:11	الطريقة التقليدية
17.64	17:3	زرع السائل المخي الشوكي بمزارع فارينت
5.88	17:1	زرع رسابة السائل الشوكي بمزارع فارينت
11.67	17:2	زرع رسابة السائل الشوكي بعد التكسير
35.2	17:6	مجموع طرق زرع فاقدة الجدار
100	17:17	المجموع الكلي

3-4: دراسة بعض الجوانب المناعية لمرضى السحايا

1-3-4: الاستجابة الخلوية غير المتخصصة لمرضى السحايا

يتبين من خلال دراسة الاستجابة الخلوية العفوية للسائل المخي الشوكي لمرضى السحايا وجود تفاوت في اعداد الخلايا البيض وتبعاً لهذا التفاوت قسم المرضى الى مجاميع اعتماداً على اعداد الخلايا فشملت المجموعة الاولى حدود التعداد للخلايا من صفر الى 50 خلية/مل وشكلت نسبة 56% وشملت المجموعة الثانية حدود التعداد من 51 الى 100 خلية/مل وشكلت نسبة 6% اما المجموعتين الثالثة والرابعة والتي شملت حدود التعداد للخلايا من 101 الى 200 و 201 الى 1000 على التوالي شكلت نسبة 12% وشملت المجموعة الاخيرة حدود التعداد للخلايا من 1001-10000 خلية/مل وشكلت النسبة 14% كما يظهرها بوضوح الجدول (9).

ومن خلال متابعة الخلايا في الاستجابة الخلوية عن طريق العد التفريقي ظهرت انواع الخلايا البيض بوضوح عند صبغها بصبغة ليشمان بين خلايا وحيدة النواة Lymphocyte او Monocyte او عدلة Neutrophil. يبين الجدول (10) ان هناك تفاوتاً في نسب الخلايا بالعد التفريقي، فقد اظهرت الخلايا وحيدة النواة استجابة اكثر من 80% بنسبة 50% من المرضى واطهرت الخلايا المتعددة الانوية استجابة اكثر من 80% بنسبة 44%. بينما ظهر في بعض المرضى استجابة متقاربة للخلايا البيض وحيدة النواة والمتعددة الانوية 50% لكل منهما بنسبة 6% للمرضى.

ووجد اختلافاً في اعداد ونسب الخلايا البيض تبعاً للمسبب المشارك الجدول (11)

اذ كان معدل الخلايا / ملم³ في اصابات بكتريا *H.influenzae b* بحدود 750 خلية/ملم³

وفي بكتريا *S.pneumoniae* كان معدل الخلايا 2150 خلية وفي بكتريا *S.agalactiae* 5100 خلية وفي بكتريا *S. aureus* فقد كان معدل الخلايا 600 خلية وفي بكتريا *K.pneumoniae* 100 خلية وكان معدل الخلايا /ملم³ في بكتريا *L.monocytogenes* 300 خلية بينما في الخمائر *Candida SP.* فكان معدل الخلايا 3000 خلية/ملم³.
وتبين بأن النسبة المئوية في العدد التقريبي للخلايا المتعددة الانوية ذات سيادة في معظم الاصابات البكتيرية بنسبة اكثر من 80% .

الجدول (9): التعداد الكلي لكريات الدم البيض في مرضى السحايا

حدود التعداد	عدد الحالات	النسبة المئوية %
50-0	28	56
100-51	3	6
200-101	6	12
1000-201	6	12
10000-1001	7	14
المجموع الكلي	50	100

الجدول (10): الاستجابة الخلوية غير المتخصصة لمرضى السحايا

النسبة %	عدد المرضى	الخلايا البيض السائدة
50	25	الخلايا اللمفاوية وحيدة النواة Lymphocyte >80%
44	22	الخلايا العدلة Neutrophil >80%
6	3	الخلايا المشتركة: العدلة + وحيدة النواة (50+50)%
100	50	المجموع الكلي

الجدول (11): الاستجابة الخلوية غير المتخصصة من الخلايا البيض المرافقة لخمج السحايا عند فحص السائل المخي الشوكي طبقاً لنوع المسبب المشارك.

النسبة المئوية في العدد التفريقي %	معدل الخلايا	عدد الخلايا خلية/ملم ³	عدد المرضى	المسبب المشارك
العدلة	وحيدة النواة			

90	10	750	1000-500	4	<i>H.influenzae b</i>
85	15	600	1000-200	3	<i>S. aureus</i>
90	10	2150	4000-300	3	<i>S.pneumoniae</i>
90	10	5100	1000-200	3	<i>S. agalactiae</i>
85	15	300	300	1	<i>K.pneumoniae</i>
85	15	100	100	1	<i>L.monocytogenes</i>
40	60	3000	5000-1000	2	<i>Candida SP.</i>
90	10	9300	10000-100	17	الكلي

2-3-4: الضد المتخصص في سائل النخاع الشوكي للمرضى المصابين بجمخ السحايا

تم التحري عن عيار الضد المتخصص في سائل النخاع الشوكي للمرضى المصابين بالجمخ البكتيري وذلك باجراء اختبار التلازن بالاناييب موضعياً وجهازياً باستخدام المستضد السطحي للمسبب المشارك بتركيز 10 وحدات دولية مع العامل المختزل 2- مركبتوايثانول (2ME) وبدونه وقد تباينت النتائج بتباين المسبب المشارك. ففي حالة بكتريا *H.influenzae b* اختلف فعل 2ME بين مختزل في حالتين للعيار الضدي الجهازى 640 الى 320 ومختزل في حالة واحدة للعيار الضدي الموضعي 32 الى 16. كما تباين فعل 2ME الموضعي في حالة بكتريا *S.aureus* بين مختزل في حالة واحدة وغير مختزل للعيار الضدي الجهازى والموضعي في حالتين اما في حالة بكتريا *S.pneumoniae* لم يحدث العامل المختزل (2ME) اختزال للعيار الضدي والجهازى وهكذا الحال بالنسبة لبقية العوامل المسببة البكتيرية الاخرى *S.agalactiae* و *K.pneumoniae* و *L.monocytogenes* بينما لا يوجد اختزال في العيار الضدي المتخصص في حالة الخمائر الجدول (12) كما تبين وجود تباين في تركيز الضد المتخصص الموضعي والجهازى باختلاف الحالة المرضية والمسبب المشارك. اذ كانت تراكيز الضد المتخصص الجهازى لبكتريا *H. influenzae b* 68.5, 48.9, 22.9, 43.9 غم/لتر بينما كانت تراكيز الضد الموضعي 2.7, 2.9, 6, 4.3 غم/لتر وكانت تراكيز الضد المتخصص الجهازى في الحالات المتسببة عن بكتريا *S.aureus* 68.5, 30.9, 30.2 غم/لتر بينما تراكيز الضد المتخصص الموضعي 3.47, 2.7, 2.03 غم/لتر اما في الحالات المتسببة عن بكتريا *S.pneumoniae* فكانت تراكيز الضد الجهازى 43.9, 43.9, 28.04 غم/لتر بينما تراكيز الضد الموضعي 4.7, 4.1, 2.7 غم/لتر وفي الحالات المتسببة عن بكتريا *S.agalactiae* فكانت تراكيز الضد الجهازى 48.9, 21.1, 20.1 غم/لتر وتراكيز الضد

الموضعي 3.5، 7.7، 1 غم/لتر. وكان تركيز الضد المتخصص الجهازى في حالة بكتريا *K.pneumoniae* 43.9 غم/لتر وتركيز الضد المتخصص الموضعي 2.7 غم/لتر وفي حالة بكتريا *L.monocytogenes* كان تركيز الضد الجهازى 43.9 غم/لتر بينما تركيز الضد الموضعي 2.1 غم/لتر وهكذا بالنسبة للحالات المتسببة عن الخمائر فقد كانت تراكيز الضد الجهازى 21.2، 56.2 غم/لتر وتراكيز الضد الموضعي 6.7، 5.7 غم/لتر.

الجدول (12): الضد المتخصص بالمسببات المشاركة مع خمج السحايا في المرضى

عيار الضد المتخصص مع 2ME		الضد المتخصص بدون 2ME				المسبب المشارك / مستضد الخلية السطحي
موضعي	جهازى	موضعي		جهازى		
		عيار	تركيز غم/لتر	عيار	تركيز غم/لتر	
32	320	32	2.7	640	68.5	<i>H.influenzae b</i>
16	320	32	2.9	320	48.9	
32	320	32	6	640	22.9	
32	640	32	4.3	640	43.9	
			3.9		46.05	M
4	320	8	3.47	640	68.5	<i>S.aureus</i>
32	640	32	2.7	640	30.9	
32	320	32	2.03	320	30.2	
			2.7		43.2	M
32	320	32	4.7	320	28.04	<i>S.pneumoniae</i>
32	320	32	4.1	320	43.9	
64	640	64	2.7	640	43.9	
			3.8		38.6	M
32	320	32	3.5	320	48.9	<i>S. agalactiae</i>
64	640	64	7.7	640	21.1	
64	640	64	1	640	20.1	
			4.06		30.03	M

64	640	64	2.7	640	43.9	<i>K.pneumoniae</i>
32	320	64	2.1	640	43.9	<i>L.monocytogenes</i>
64	640	64	6.7	640	21.2	<i>Candida SPP.</i>
32	320	32	5.7	320	56.2	
			6.2		38.7	M

M: المعدل

3-3-4: الضد المتخصص بـ *H.influenzae b* في مرضى السحايا

وفي دراسة للتحري عن الضد المتخصص لبكتريا *H.influenzae b* تم استخلاص مستضد المحفظة ومستضد الغلاف البروتيني الخارجي للبكتريا واجراء اختبار التلازن بالانابيب لهذه المستضدات بتركيز 10 وحدة دولية مع الضد الموضعي (CSF) وال ضد الجهازى (المصل) للمرضى. اذ يلاحظ من الجدول (13) ان هناك تبايناً في عيار الضد المتخصص الموضعي والجهازى بتباين الحالة والمستضد. ففي الحالة الاولى كان عيار الضد المتخصص الموضعي مع مستضد البروتين الغشائي 64 مقارنة مع مستضد المحفظة 32 وكان عيار الضد الجهازى مع مستضد البروتين الغشائي 320 مقارنة مع مستضد المحفظة كان 640.

واعطت الحالة الثانية العيار 32 لل ضد الموضعي المتخصص مع مستضد البروتين الغشائي ومستضد المحفظة بينما اختلف الضد المتخصص الجهازى لمستضد البروتين الغشائي عن مستضد المحفظة اذ اعطى الاول العيار 320 واعطى الثاني العيار 640 كذلك الحال بالنسبة للحالة المرضية الثالثة اما الحالة المرضية الرابعة فكانت مشابهة للحالة الاولى ومن الملاحظ انه لم تختلف العيارات التي اعطاها الضد المتخصص الموضعي عند المعايرة مع مستضد البروتين الغشائي الخارجى او مع مستضد المحفظة اذ كان العيار 32 اقل عيار والعيار 64 اعلى عيار. كذلك الحال بالنسبة لل ضد الجهازى عند المعايرة مع مستضد البروتين الخارجى او مع مستضد المحفظة اعطى اقل عيار 320 واعلى عيار 460.

الجدول (13): الضد المتخصص بـ *H.influenzae b* في مرضى السحايا

رقم الحالة	الضد الموضعي (CSF) عند المعايرة مع		الضد الجهازي (المصل) عند المعايرة مع		
	مستضد البروتين الغشائي الخارجي		مستضد البروتين الغشائي الخارجي		
	مستضد المحفظة	مستضد المحفظة	مستضد المحفظة	مستضد المحفظة	
	عيار	تركيز	عيار	تركيز	
1	64	2.7	32	68.5	640
2	32	2.9	32	48.9	640
3	64	6	64	22.9	640
4	64	4.3	32	43.9	640
M±SD		3.9±1.5		46.05±18.7	

4-3-4: الضد الموضعي والجهازي المتخصص في مرضى السحايا

باستخدام مستضد المحفظة المحضر من بكتريا *H. influenzae b* ومعايرته مع الضد الموضعي والضد المصلي لمرضى السحايا، توزع المرضى باربع مجاميع الاولى من مريض واحد فى الموضعي العيار 2 وفي الجهازي العيار 40. والمجموعة الثانية من ثلاث مرضى في الموضعي فقط والعيار تراوح بين (2-4). اما المجموعة الثالثة فكانت من تسع مرضى بعيار (20-40) في المصل فقط. وكانت المجموعة الرابعة من 37 مريض سلبية لوجود الضد في كل من الموضعي والجهازي كما يوضحها الجدول (14). كما تبين ان نسبة الحساسية التشخيصية للضد الموضعي لبكتريا *H. influenzae b* 52% مقارنة في الجهازي 55% اما التخصص التشخيصي فشكل نسبة 91% للضد الموضعي و 81% للضد الجهازي.

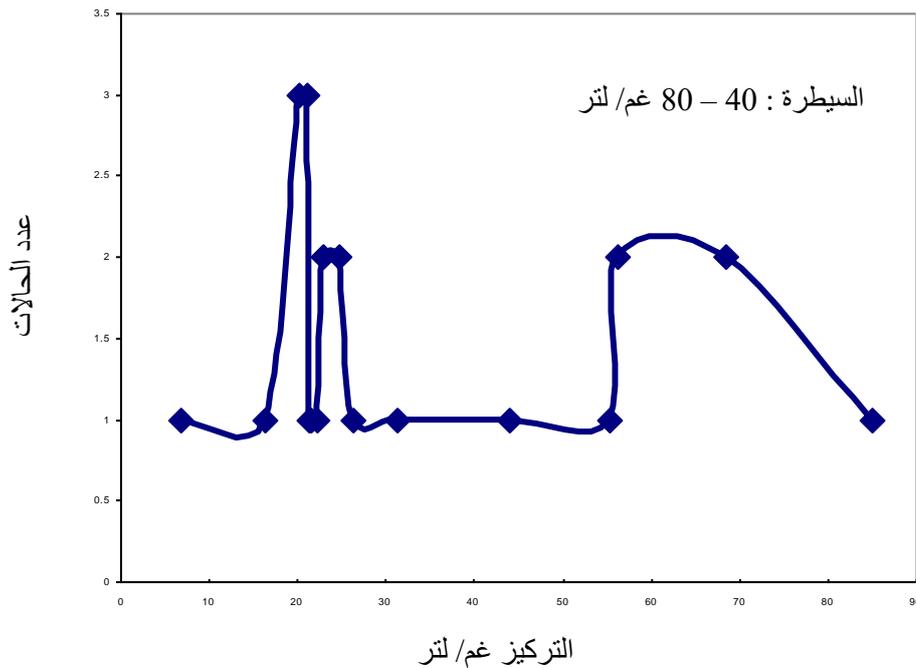
الجدول (14) : عيار الضد الموضعي والجهازي في السائل المخي الشوكي مع مستضد المحفظة المحضر من بكتريا *H. influenzae b* لمرضى بالسحايا

المرضى	عدد الحالات	عيار الضد الموضعي في CSF	عيار الضد الجهازي في المصل
المجموعة الاولى	1	2	40
المجموعة الثانية	3	4-2	-
المجموعة الثالثة	9	-	40-20
المجموعة الرابعة	37	-	-
*الحساسية التشخيصية %		52	55
*التخصص التشخيصي %		91	81

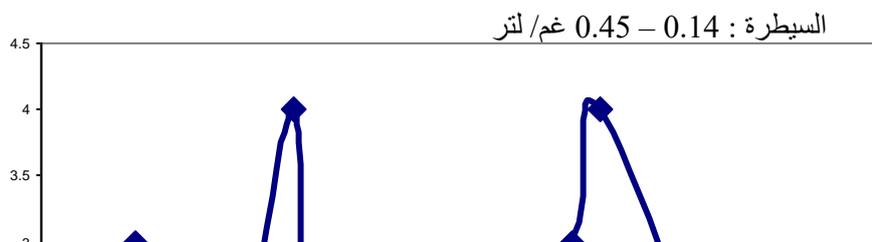
5-3-4: تركيز البروتين الكلي والموضعي لمرضى

H.influenzae b

اختلف تركيز البروتين الكلي والموضعي لمرضى *H.influenzae b* باختلاف الحالة المرضية بين حالات عالية البروتين واخرى متوسطة او منخفضة اذ يبين الشكل (7) تركيز البروتين الكلي لجميع المرضى الذين يعتقد اصابتهم ببكتريا سواء الذين أعطوا نتيجة زرع موجب والذين اعطوا نتيجة موجبة عند التحري عن الضد المتخصص الموضعي والجهازى لـ *H. influenzae b* في مرضى السحايا والمجموعة الذي أعطت نتيجة موجبة عند التحري عن المستضدية Antigenimia الموضعية والجهازية المتخصصة بذات البكتريا في مرضى السحايا. كما يبين الشكل (8) تركيز البروتين الموضعي للمجاميع المذكورة اعلاه. علماً ان تركيز البروتين الطبيعي الكلي 40-80 غم / لتر وتركيز البروتين الموضعي 0.14 - 0.45 غم/ لتر للسيطرة .



الشكل (7): تركيز البروتين الكلي غم/ لتر لمرضى *H. influenzae b*



التركيز غم/ لتر

الشكل (8): تركيز البروتين الموضعي غم/ لتر لمرضى *H. influenzae b*.

4-3-6: تركيز الكلوبولين المناعي المختلفة في المصل لمرضى السحايا

استخدمت طريقة مانسيني ولوريل في التحري عن صنف الكلوبولين المناعي وتركيزه في مصل المرضى. ولوحظ ان هناك تبايناً في تراكيز اصناف الكلوبولين المناعي باختلاف المسبب المشارك مقارنة بالقيم المرجعية كما تظهر في الجدول (A-15). اذ يلاحظ ان هناك ارتفاعاً في تركيز الكلوبولينات المناعية في بعض اصنافها مثل IgM في بعض الحالات مقارنة بالسيطرة في حين سجلت حالات اخرى ارتفاعاً بسيطاً. بينما سجلت تراكيز الكلوبولين المناعي باصنافها المختلفة ارتفاعاً ملحوظاً في جميع المرضى في حالة عدم الاخذ بنظر الاعتبار نوع المسبب مقارنة بالقيم المرجعية كما في الجدول (B-15).

4-3-7: تركيز اجزاء المتمم C₃ و C₄ في المصل لمرضى السحايا

تباين تركيز اجزاء المتمم C₃ و C₄ في مصل المرضى باختلاف المسبب المشارك بين حالات سببت ارتفاعاً كبيراً وحالات اخرى كان الارتفاع بسيطاً مقارنة بالسيطرة كما يظهرها الجدول (A-16). وفي حالة عدم الاخذ بنظر الاعتبار العامل المسبب كما في

الجدول (B-16) يلاحظ ان هناك ارتفاعاً ملحوظاً في تراكيز اصناف المتمم C₃ و C₄ مقارنة بالقيم المرجعية في الحالات المرضية مختلفة.

الجدول (15): تركيز اصناف الكلوبولين المناعي في مرضى السحايا ملغم/ دل
A- حسب نوع المسبب المشارك

معدل التركيز ملغم/ دل			مرضى السحايا بالمسببات المختلفة
IgM	IgG	IgA	
1146.02	93.3	128.45	<i>H.influenzae b</i>
2205.8	299.8	94.9	<i>S.aureus</i>
2205.8	152.2	127.6	<i>S.pneumoniae</i>
1337.5	82.13	446.3	<i>S.agalactiae</i>
98.8	10.5	23.2	<i>K.pneumoniae</i>
98.8	10.5	23.2	<i>L.monocytogenes</i>
1359.4	64.3	36.8	<i>Candida. SP.</i>
			السيطرة
1192.9	155.9	159.9	الاسوياء

B. حسب الحالات المرضية جميعاً

السيطرة		معدل التركيز ملغم/دل	الصف
قيم مرجعية	اسوياء		
152-0	159.9	162.5	IgA
108-0	155.9	125.3	IgM
1597-190	1192.9	2353.01	IgG

الجدول (16): تركيز اجزاء المتمم C₃ و C₄ في مرضى السحايا
A. حسب نوع المسبب المشارك

معدل التركيز ملغم/ دل		مرض السحايا بالمسببات المختلفة
C ₄	C ₃	
27.7	129	<i>H.influenzae b</i>
41.5	141.7	<i>S.aureus</i>
44.5	216.3	<i>S.pneumoniae</i>
19.1	53.6	<i>S.agalactiae</i>
4.3	173.5	<i>K.pneumoniae</i>
8.9	19.8	<i>L.monocytogenes</i>
26.2	105.9	<i>Candida SP.</i>
		السيطرة
31.2	127.2	الاسوياء

B. لجميع الحالات المرضية

السيطرة		معدل التركيز ملغم/دل	الصف
قيم مرجعية	اسوياء		
160-80	127.2	112.55	C ₃
40-20	31.2	26.5	C ₄

8-3-4: المستضدية Antigenimia الموضعية والجهازية
المتخصصة ببكتريا *H.influenzae b* في مرضى
السحايا

بعد تغطية مصل الارنب المتخصص بمستضد المحفظة على كريات دم الخروف المدبوغة، جرى اختبار التلازن الدموي مع عالق البروتين المستخلص من السائل المخي

الشوكي (CSF) والمصل للمرضى وكانت نتائج الدراسة كما تظهر في الجدول (17) ظهور مجاميع مختلفة تبعاً للمستضدية الموضعية والجهازية واختلاف مستوى المستضدية.

فقد شملت المجموعة الاولى ظهور مستضدية موضعية وجهازية اعطت الموضعية مستوى 32 و64 باختلاف الحالات واعطت الجهازية 640 لمختلف المرضى. وشملت المجموعة الثانية ظهور مستضدية موضعية فقط واختلفت نتيجة المعايرة باختلاف الحالة اذ اعطت مستوى 8 في حالتين ومستوى 16 في 4 حالات وظهر المستوى 32 في 4 حالات واخيراً ظهر المستوى 64 في حالتين . واطهرت المجموعة الثالثة مستضدية جهازية لحالة واحدة لمستوى 80 اما المجموعة الاخيرة لم تظهر مستضدية موضعية ولاجهازية.

وشكلت الحساسية التشخيصية للمستضد الموضعي نسبة 58% مقارنة بالمستضد الجهازية 52% اما التخصص التشخيصي كانت النسبة 74% للمستضد الموضعي و91% للمستضد الجهازية

**الجدول (17) : المستضدية الموضعية والجهازية المتخصصة
ببكتريا *H. influenzae* في مرضى السحايا**

المرضى	عدد العينات	عيار المستضد الموضعي عند المعايرة مع ضد المحفظة	عيار المستضد الجهازية عند المعايرة مع ضد المحفظة
المجموعة الاولى	2	64	640
	1	32	640
المجموعة الثانية	2	8	-
	4	16	-
	4	32	-
	2	64	-
المجموعة الثالثة	1	-	80
المجموعة الرابعة	34	-	-
الحساسية التشخيصية%		58	52
التخصص التشخيصي%		74	91
المجموع الكلي	50		

4-3-9: الجدوى العملية للطرق المناعية في تشخيص السحايا في الانسان

يظهر الجدول (18) صورة واضحة للطرق المناعية المستخدمة في تشخيص السحايا في الانسان. فقد برزت طريقة التشخيص عن طريق الاستجابة الخلوية غير المتخصصة للخلايا البيض بنسبة 100%.

واخذت طريقة المستضدية النخاعية الشوكية نسبة 30% ثم تلتها الطرق الاخرى بنسب متفاوتة اذ شكلت طريقة الضد المصلي نسبة 20% والمستضدية الدموية وتركيز الكلوبولين الموضعي 8% وتباينت نسبة الجهازية للموضعية 25%-75% ولم يعطي تركيز البروتين الكلي مقياس في تحديد الاصابة وهذا يعطي صورة لاولوية الطرق المناعية المستخدمة في هذه الدراسة.

الجدول (18): الجدوى العملية للطرق المناعية في تشخيص السحايا في الانسان

النسبة %	العدد : الكلي	الطريقة
100	50:50	1. الاستجابة الخلوية غير المتخصصة للخلايا البيض
	50:0	2. البروتين
8	50:4	3. الكلوبولين المناعي الموضعي
20	50:10	4. الضد المصلي
75-25	1 للعيار 1:10، 3 للعيار 1:20	5. نسب الجهازية للموضعية
8	50:4	6. المستضدية الدموية
30	50:15	7. المستضدية النخاعية الشوكية
66	50:33	المجموع الكلي

4-3-10: جدوى الطرق المختلفة في تشخيص خمج السحايا البشري باستخدام احصاء Z للفرق بين نسبتين

يلاحظ من الجدول (19) ان هناك تباين في معنوية الطرق المستخدمة في تشخيص خمج السحايا. اذ يلاحظ ان الضد الجهازية اكثر معنوياً وذا جدوى عملية اكثر من الموضعي، والمستضدية الموضعية اكثر معنوية من الجهازية، ومجموع المستضدية الموضعية والجهازية معنوياً اكثر من مجموع الضد الموضعي والجهازية. كما يلاحظ ان ذات الجدار اكثر معنوياً من فاقدة الجدار وان المستضدية اكثر معنوياً من التشخيص البكتريولوجي. كما ان التشخيص البكتريولوجي اكثر معنوياً من الضدية

الجدول (19): دراسة جدوى الطرق المختلفة في تشخيص خمج السحايا البشري باستخدام احصاء Z للفرق بين نسبتين $p \leq 0.05$

قيمة Z		نوع الطريقة
جدولية	محسوبة	
0.9115	1.33	الضدية الجهازية والموضعية
0.9906	2.26	المستضدية الموضعية والجهازية
0.853	1.0559	المستضدية الكلية والضدية الكلية
0.853	1.0555	ذات الجدار وفاقدة الجدار
0.6734	0.4422	المستضدية والبكتريولوجي
0.733	0.77	البكتريولوجي والضدية

4-4 : الدراسة المناعية لـ *H.influenzae b* في الأرنب

1-4-4: المناعة الموضعية والجهازية في الارنب الممنع بمستضد البروتين الغشائي الخارجي لبكتريا *H.influenzae b*

لمعرفة القابلية التمنيعية لمستضد البروتين الغشائي الخارجي لبكتريا *H.influenzae b* في الحيوان المختبري بعد حقن المستضد في الارنب بمنوال ثابت تم قياس تركيز الضد المتخصص الموضعي والجهازي و عيار الضد المتخصص ونسبة العيار اضافة الى اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض واختبار الجلد الجدول (20). فقد لوحظ موضعياً العيار 64 وجهازياً 640 للحيوان الاول والثاني وبذلك تصبح نسبة العيار الجهازية للموضعية 1:10 كما تبين وجود بعض الاختلاف في تراكيز الضد المتخصص لحيواني التجربة مقارنة بالسيطرة الاختلاف واضح اذ كانت تراكيز الضد الموضعي المتخصص للزائدة 2.7 غم/ لتر في الحيوان الاول و 1 غم/ لتر في الحيوان الثاني مقارنة بالسيطرة 4.3 غم/ لتر و 4.7 غم/ لتر وكانت التراكيز للعفج في الحيوان الاول 2.7 غم/ لتر والحيوان الثاني 1 غم/ لتر مقارنة بالسيطرة 3.89 غم/ لتر و 4.2 غم/ لتر. اما جهازياً فقد كانت تراكيز الضد المتخصص للمصل في الحيوان الاول 33.1 غم/ لتر والحيوان الثاني 21.2 غم/ لتر مقارنة بالسيطرة 60.1 غم/ لتر و 60.5 غم/ لتر.

وفي اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض يلاحظ في الجدول عدم وجود فرق معنوي في حيوانات الاختبار مقارنة بحيوانات السيطرة يعني عدم حدوث استجابة خلوية متوسطة بالخلايا T بفرط الحساسية ظاهرة عند حقن مستضد بكتريا *H.influenzae b* في الحيوان المختبري اضافة الى عدم ظهور علامات التحسس الخلوي (الاحمرار، التصلب) عند حقن مستخلص راشح الخلايا للبكتريا المذكورة تحت الجلد اذ اعطى اختبار الجلد سالب لحيوانات التجربة.

ومن هذا يتبين بان موديل الارنب الممنع ببكتريا *H.influenzae b* يؤشر مناعة موضعية وجهازية متخصصة ببكتريا *H.influenzae b* وكان تفاعل تثبيط هجرة الخلايا البيض غير معنوي.

الجدول (20): المناعة الموضعية والجهازية للارنب الممنع بمستضد البروتين الغشائي الخارجي لبكتريا *H.influenzae b*

اختبار الجلد بفرط الحساسية المتأخر	اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض			نسبة العيار في الجهازية للموضعية	جهازي		موضعي				الارنب
	مصل	عفج	زائدة		مصل		عفج		زائدة		
					عيار	تركيز غم/لتر	عيار	تركيز غم/لتر	عيار	تركيز غم/لتر	الاختبار
-	1	0.9	1	1:10	640	33.1	64	2.7	64	2.7	1
-	0.9	1.08	0.9	1:10	640	21.2	64	1	64	1	2
											السيطرة
	0.9	0.8	0.9			60.1		3.89		4.3	1
	0.8	0.9	0.8			60.5		4.2		4.7	2

4-4-2: المناعة الموضعية والجهازية للارنب الممنع بمستضد المحفظة لبكتريا *H.influenzae b*

لمعرفة القابلية التمنيعية لمستضد المحفظة لبكتريا *H.influenzae b* في الحيوان المختبري تم حقن المستضد في الارنب بمنوال تمنيعي ثابت وقياس تراكيز الضد المتخصص الموضعي والجهازي و عيار الضد واجراء اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض واختبار الجلد. كانت النتائج كما يظهر في الجدول (21) وجود تقارب في عيارات الضد الجهازي والموضعي في حيوانات التجربة اذ كان العيار الضدي الموضعي 64، والجهازي 640 في الحيوان الاول والثاني وبذلك تصبح نسبة العيار في الجهازية للموضعية 1:10. كما وجد تباين في تراكيز الضد الموضعي والجهازي في حيوانات التجربة فقد لوحظ انخفاض في التراكيز مقارنة بالسيطرة. فقد كانت تراكيز الضد المتخصص للزائدة (1، 2.7) غم/لتر للحيوان الاول والثاني مقارنة بالسيطرة 4.3 غم/لتر و4.7 غم/لتر بينما كانت تراكيز الضد للعفج (7.7، 4.3) غم/لتر للحيوان الاول والثاني مقارنة بالسيطرة 3.89 غم/لتر و4.2 غم/لتر اما جهازياً فقد اظهرت تراكيز الضد الجهازي اختلافاً بسيطاً في حيوانات التجربة مقارنة بالسيطرة كان الاختلاف اكبر اذ اظهر الحيوان الاول تركيز 26.3 غم/لتر بينما اظهر الحيوان الثاني تركيز 31.42 غم/لتر مقارنة بالسيطرة 6.01 غم/لتر و 6.05 غم/لتر.

كذلك يظهر في الجدول انه لا توجد فروقات معنوية في اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض مقارنة بالسيطرة مما يعني عدم وجود استجابة خلوية متوسطة بالخلايا T بفرط الحساسية ظاهرة كما يؤكد اختبار الجلد اذ لم تظهر علامات الاستجابة الخلوية (الاحمرار-التصلب) على حيوانات التجربة.

ومن هذا يتبين بان موديل الارنب الممنع بمستضد بكتريا *H.influenzae b* يؤشر مناعة موضعية وجهازية متخصصة بـ *H.influenzae b* وكان تفاعل تثبيط هجرة الخلايا البيض غير معنوي.

جدول (21): المناعة الموضعية والجهازية للارنب الممنع بمستضد المحفظة لبكتريا *H.influenzae b*

اختبار الجلد بفرط الحساسية المتأخر	اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض			نسبة العيار في الجهازية للموضعية	جهازي		موضعي				الارنب
	مصل	عفج	زائدة		مصل		عفج		زائدة		
					عيار	تركيز غم/لتر	عيار	تركيز غم/لتر	عيار	تركيز غم/لتر	الاختبار
-	1	1	1.09	1:10	640	26.3	64	7.7	64	1	1
-	1	1	1		640	31.42	64	4.3	64	2.7	2
											السيطرة
	1	0.9	0.9			60.1		3.89		4.3	1
	0.8	0.9	0.8			60.5		4.2		4.7	2

Chapter Five الفصل الخامس

Discussion المناقشة

1-5: الصفات الفيزيائية والكيميائية للسائل المخي الشوكي لمرضى السحايا

A: الوصف الفيزيائي

تم ملاحظة الصفات الفيزيائية لعينة السائل المخي الشوكي وتبين أن 74.19% من سائل النخاع الشوكي رائق و 13.97% ذو عكارة و 9.67% ذو لون اصفر و 2.15% دموي اذ يعزى سبب العكورة والاصفرار في السائل المخي الشوكي الى ارتفاع عدد الخلايا البيض او وجود البكتريا باعداد كثيرة ويعتبر هذا تشخيص اولي للإصابة بجمخ السحايا. أما لون بعض العينات ذات مظهر رائق فهذا يعني ان عدد الخلايا البيض منخفضاً او قليلاً وهذا ما يحدث في بداية الإصابة بهذا المرض او قد يكون دليل اولي لعدم وجود إصابة بهذا المرض. و العينات بلون الدم يعزى الى ارتفاع عدد الخلايا الحمر في النموذج نتيجة تمزق الاوعية الدموية عند وخز المنطقة بإبرة السحب Gray and (Mastroianni *et al.*, 1998 ;Ahmed *et al.*, 1996; Fedorko, 1992)

B: الوصف الكيميائي

بينت نتائج الدراسة ظهور مجموعتين من المرضى عند قياس تركيز البروتين والسكر لعينة السائل المخي الشوكي الجدول (B-4) شكلت المجموعة الاولى الصفة بروتين عالي سكر واطى نسبة 75.2% والمجموعة الثانية الصفة سكر عالي بروتين واطى نسبة 24.7% وهذا يتفق مع دراسات اخرى (Shnawa & Al-Gebori, 1998; Shnawa & Al-Amedi, 1998). ذكر أن الزيادة في تركيز البروتين الكلي في عينة السائل المخي الشوكي عن المستوى الطبيعي ربما يعبر عن استجابة مناعية ضد المسبب المرضي او نتيجة تغيير نفاذية الاغشية الدماغية (BBB) Blood Brain Barrier عند الإصابة بهذا المرض وانخفاض السكر عن معدله الطبيعي ربما يعود الى عجز نقل السكر من البلازما الى csf واستهلاكه من قبل خلايا جسم المضيف في التفاعلات الايضية او استهلاكه من قبل البكتريا في عملية التخمر السكري (Kjeldsberg & Glycolysis (Krieg, 1984). ويعتبر الزيادة في تركيز البروتين وانخفاض السكر مؤشر اولي للإصابة بجمخ السحايا البكتيري (Gray & Fedorko, 1992; Ahmed *et al.*, 1996).

2-5: الفحص البكتريولوجي للسائل المخي الشوكي والاختبارات المعززة الأخرى

1-2-5: الفحص المباشر

يعتبر الفحص المباشر مرحلة اولية في تشخيص عينة السائل المخي الشوكي. اذ من خلالها يمكن تمييز الاستجابة الخلوية والايغاز بوجود مسبب مرض بكتيري او فايروس او عدم وجود مسبب (Tunkle & Scheld, 1993).

5-2-2: وصف النمو على طبق الزرع الاولي

كانت نتائج الزرع الاولية ايجابية وسلبية، والايجابية أما احادية المسبب او ثنائية المسبب وذلك من وصف المسبب من خلال تنوع النمو ومظهر المستعمرة فيما اذا كان مسبب بكتيري ذات جدار او مسبب بكتيري فاقد للجدار احادي المسبب او اكثر من مسبب بكتيري.

يتبين من هذه الدراسة وجود عدة مسببات بكتيرية ذات جدار واخرى فاقدة للجدار وتبين ايضاً من الشكل (3) ان فاقدات الجدار وجدت اما داخل الخلية الالتهابية او ملتصقة على سطوح الخلايا , ولم يتبين ان فاقدات الجدار البكتيري حرة في سائل المخ الشوكي وهذا مستنتج من طرق زرع فاقدة الجدار و يتفق هذا مع (Al-Nassiry, 2002; Domingue et al., 1997)

5-2-3: وصف المسببات المشاركة

بينت الدراسة ظهور مجاميع من المسببات البكتيرية المشاركة بجمع السحايا من خلال الفحص المجهرى وفحص النمو على الاوساط التفريرية والاعنائية والتعرف الكيموحيوية وكانت مطابقة في وصفها الى الاوصاف القياسية (MacFadin, 2000).

5-2-4: تنوع المسببات المشاركة مع خمج السحايا

: *S.pneumoniae, S.agalactiae, H. influenzae b*

أظهرت نتائج الدراسة اختلاف في نوع المسبب المشارك بين مسبب بكتيري ذات جدار واخر فاقد للجدار كما اختلف جنس ونوع المسبب المشارك الجدول (5). فقد اظهرت بكتريا *H. influenzae b* اعلى الاصابات البكتيرية تلتها بكتريا *S.aureus* و *S.pneumoniae* و *S. agalactiae* ثم بكتريا *K. pneumoniae* وبكتريا *L.monocytogenes*. وهذا يتفق مع دراسات اخرى اجريت في محافظة بابل تؤكد بان الاصابة ببكتريا *H.influenzae b* اكثر شيوعاً في الاطفال تليها بكتريا *S.pneumoniae* و *S. agalactiae* (Al-Khafaji, 1999; Shnawa & Al-Gebori, 1998). بينما لم يتفق مع دراسة (Al-Mawla, 2002) في بغداد الذي وجد بان المسبب الرئيسي لخمج السحايا بكتريا *S.pneumoniae* تليها بكتريا *H. influenzae b*. وقد يعزى هذا الاختلاف في عدد الاصابات ونوع المسبب المرضي الى مجموعة من العوامل منها اختلاف الظروف البيئية والاجتماعية والخدمات الصحية اضافة الى سيادة الكائن المجهرى حسب المكان والوقت المتواجد فيه اذ يعد الاستعمار البكتيري في منطقة الانف البلعومي من اكثر عوامل الإصابة.

S. aureus : وحصلت بكتريا *S. aureus* نسبة لا بأس بها في حدوث المرض كما في دراسات أخرى (Al-Dahhan, 1993 ; Al-Mawla, 2002). وتعتبر هذه البكتريا

مسبب غير شائع وتشكل نسبة (1-9%) من الحالات ويلاحظ في الرضع وتنتقل هذه البكتريا من طفل الى اخر في دور الحضانه او نتيجة التعرض للتلوث في حالات الولادة (Kim et al.,1989; Mead, 1985).

K.pneumoniae : وكان لبكتريا *K.pneumoniae* دور في حدوث الاصابة في هذه الدراسة وهذا يتفق مع دراسات اخرى اذ تم عزل البكتريا المعوية في أطفال مصابين بمرض السحايا (Al-Dalla,et al. 2002 ;Al-Rawy and Al-Attar,2002). وتعد هذه البكتريا مهمة في حدوث الاصابة بمرض التهاب السحايا في الاطفال وخصوصاً حديثي الولادة وقد تعزى الاصابة بهذه البكتريا الى التلوث خلال المرور من قناة الولادة اثناء وضع الجنين اذ غالباً ما تكتسب من انواع البكتريا في مهبل الام الوالدة Maternal Vaginal Flora. وتحدث الاصابة بعد تمزق الاغشية الولادية اثناء تعسر الولادة وان الاحياء المكتسبة من قبل الرضيع من قناة الولادة اثناء عملية الوضع تستعمر الجلد والاعشية المخاطية وقد يتبع ذلك الوصول الى الدم بعد ان تستعمر الجزء العلوي من المسالك التنفسية ، وقد تنتقل البكتريا من طفل الى اخر بدور الحضانه (Mead, 1985;Mulder and Zanen,1984).

L.monocytogenes : كما يشير الجدول الى حدوث الاصابة ببكتريا *L.monocytogenes* التي تعد من المسببات النادرة لخمج السحايا في العراق بينما تعد من المسببات المهمة في الدول المتقدمة. وتكون الاصابة بهذه البكتريا في الاشخاص الذي يعانون خلل كبير في الجهاز المناعي او نتيجة الافراط في تناول المضادات الحيوية (Levidioton et al., 2004; Douglas et al., 2004).

الخمائر: كما تبين حدوث المرض نتيجة الاصابة بالخمائر وهذا يتفق مع دراسة (Verduyn et al., 2004) فقد اشار الى ان الاصابة بالخمائر نادرة الحدوث حيث وجدت في الاطفال حديثي الولادة والمنخفضي المناعة والاشخاص ذوي الاعتلال المناعي.

5-2-5: موديل تجريبي لدراسة امراضية *H.influenzae b* في

الفار الابيض بالحقن عبر القحف

تم اختيار بكتريا *H. influenzae b* باعتبارها اكثر واهم المسببات البكتيرية لخمج السحايا في الأطفال. واختيرت الفئران موديلاً أنموذجاً للأمراضية لأنها تعطي خمج سحايا بكتيريا حاداً. فضلاً عن إمكانية استخدام عدد كبير من الحيوانات في الاختبار وبالامكان استخدام طرق الحقن الموازية لطرق الاصابة في الانسان اذ ان الاحداث المرافقة لعملية الحقن والاعراض السريرية للحيوان مشابهة لما يظهر في الانسان (Marks et al., 1982) فقد ظهرت اعراض المرض أنياً بعد الاصابة واضحة في الفئران كما تظهر في الشكل (C,B,A 4) ومتأخرة بعد 7 يوم وهي الموت. تحدد عملية الاصابة بمقدار الجرعة

والتركيز المعطاة للحيوان كما يتحدد وقت ظهور الاعراض وتطور الحالة المرضية اذ قد تظهر الاعراض بعد مرور ساعتين من الحقن او تظهر مباشرة كما تختلف الاستجابة مع اختلاف حجم وعمر الحيوان وربما تؤدي الاصابة الى الوفاة خلال ساعات او بعد مرور 24 او 48 ساعة وربما تستمر الحيوانات في العيش ايام وتصل الى حالة الازمان او الى الحمل للمرض وكل هذا يعتمد على مقدار العدد البكتيري الذي يصل الدماغ والحالة المناعية للحيوان ، طريقة دخول الميكروب وفيما اذا كان ممرض في الإنسان أولاً (Marks et al.,1982 Smith et al., 1973).

وقد استخدمت طريقة الحقن في الدماغ باعتبارها طريقة ذات تأثير مباشر وسريع الإصابة (Chiavolini et al., 2004). تحاكي طريقة الإصابة الطبيعية عن طريق انتشار الميكروب من الجيوب الأنفية او من الانف البلعومي او دخوله عن طريق جرح او خدش مباشرة الى الجهاز العصبي والسماح بدراسة التأثيرات السريرية والتأثيرات السايولوجية والنسجية على الدماغ بوقت اسرع (Chiavolini et al., 2004) بينما ذكر (Smith et al., 1973) أن طريقة الإصابة في الدماغ مباشرة لا تسمح بدراسة الامراض السريرية الاولية للمرض اذ تحفز استجابة التهابية موضعية مباشرة بعد الحقن وقد يكون هناك عوارض جانبية في منطقة الإصابة غير مطلوبة.

تم متابعة الأعراض السريرية على الحيوانات كما تظهر في الجدول (10) وبعد موت الحيوان استخرج الدماغ وعمل مسحة مصبوغة بصبغة كرام للسائل المحيط به لوحظ وجود عدد من البكتريا بمختلف اشكالها وظهور عدد كبير من الخلايا البيض بمختلف اشكالها التفريقية وعند عمل المقاطع النسيجية اكدت حدوث الإصابة حيث لوحظ خمج الاغشية السحائية الدماغية مصحوباً بوجود عدد كبير من الخلايا البيض اللمفية والمتعددة النواة مما يعطي صورة واضحة لحالة المرض اذ تشير المقاطع وصول الحالة الى وضع يوصف بدون حاد تحول الى شكل المرض الحاد. وتتفق هذه الاحداث مع دراسات اخرى في هذا المجال (Smith et al., 1973; Chiavolini et al., 1989; Diab et al., 1999; et al., 2004).

3-5 دراسة

بعض الجوانب المناعية لمرضى السحايا

1-3-5: الاستجابة الخلوية غير المتخصصة لمرضى السحايا

من الطرق التشخيصية المباشرة لمرض خمج السحايا الدماغية هو حساب عدد الخلايا الكلي والتفريقي للخلايا البيض اذ تؤكد الدراسة الحالية ودراسات اخرى (Shnawa & Al-Gebori, 1998; Al-Khafaji, 1999; Al-Mawla, 2002) شيوع الخلايا متعددة الانوية في السائل المخي الشوكي في الاصابات البكتيرية جدول (10، 11). حيث تعتبر الزيادة في عدد الخلايا البيض عند المصابين بهذا المرض استجابة مناعية غير متخصصة ضد المسبب الميكروبي وتعد مهمة في التفريق بين التهاب السحايا البكتيري والتهاب السحايا الفايروسي واكدت الدراسات ان وجود

الخلايا متعددة الانوية في السائل المخي الشوكي دلالة على حصول اصابة بكتيرية (Suzuki *et al.*, 2003 ; Gray & Fedorko, 1992).

5-3-2: الضد المتخصص بالمسببات المشاركة مع خمج السحايا

في المرضى والضع المتخصص بـ *H. influenzae b*

لإعطاء صورة مناعية شاملة متكاملة (بحود الامكانات المتوفرة لنا) للمرض تم التحري عن الضد المتخصص بالمسببات المشاركة مع خمج السحايا حيث جرى اختبار التلازن بالانابيب لتحديد العيار مع العامل المختزل 2ME وبدونه حيث لم تؤثر هذه المادة كثيراً مما يعني ان الاضداد الافرازية والمصلية مقاومة لفعل (2ME) الجدول (12). كما وجد ان عيار الضد الجهازى والموضعى المتخصص بالمسببات المشاركة متقارب فقد كان العيار الجهازى في غالب الاحيان 640 و320 بينما كان العيار الموضعى 64 و32. ولم يختلف العيار كثيراً في حالة استخدام مستضد المحفظة والغلاف البروتينى الخارجى لبكتريا *H. influenzae b* جدول (3). فقد اشارت دراسة (Anderson *et al.*, 1972) اختلاف العيارات باختلاف الحالة المرضية ونوع السلالة وسيادة العيار 64 و32 في الموضعى والعيار 160 للجهازى في بعض السلالات، كما بينت الدراسة التلازن الدموى في تشخيص السحايا ولمختلف السلالات المستخدمة في الدراسة. وشارت الى ان الفعالية المضادة لبكتريا *H. influenzae b* تعزى ليست فقط الى الاجسام المضادة للكبسولة وانما للاجسام المضادة الموجهة ضد المستضد الجسمى ولكن بشكل اقل اهمية كما يظهر من الجدول اختلاف تركيز الضد الموضعى والجهازى باختلاف الحالة المرضية ونوع العامل المسبب وهذا يتفق مع (Mawla, 2002; Al-Dahan, 1993; Al-) ونظراً لتقارب النتائج في اختبار المستضد السطحي ومستضد المحفظة وبروتين الغلاف الخارجى لبكتريا *H. influenzae b* فقد تم التخصص بالمستضدين المذكورين واستمرارية الدراسة في الحيوان المختبرى.

ويمكن استنباط مستويات مؤشرة للحالة السريرية للمريض 32 و64 فما فوق وبالنسبة للجهازية 320 و640 وهذا يتفق مع (Shnawa & Al-Saadi, 2002); (Shnawa & Mehdi, 2004).

5-3-3: الضد الموضعى والجهازى المتخصص بـ

H. influenzae b فى مرضى السحايا

من الطرق المختبرية الشائعة في تشخيص الامراض هي الطرق المصلية بوصفها طرقاً سريعة وبسيطة وتتناسب مع وضع المريض الصحى الذى يكون بأمس الحاجة إلى التشخيص السريع لانقاذ حياته. يعتبر فحص اللاتكس Latex Agglutination في التحري عن الاجسام المضادة في عينة السائل المخى الشوكى من الفحوص المهمة والسريعة في تشخيص خمج السحايا ولعدم امكانية الحصول عليه استخدم نوعين من الاختبارات المصلية المختبرية احدهما التحري عن الضد الموضعى والجهازى المتخصص بـ *H.*

influenzae b في مرضى السحايا (Sipple *et al.*, 1984). ومن خلال الجدول (14) لوحظ ظهور عدد من المرضى اعطوا نتيجة موجبة عند التحري عن الضد الموضعي المتخصص والجهازية.

ان معظم البكتريا المسببة لخمج السحايا ذات محفظة وخلال مرحلة الاصابة تطرح كميات كبيرة من هذه المواد المتعددة السكريات Polysaccharide الى السوائل الجسمية مثل المصل وسائل النخاع الشوكي. تكون هذه المواد معرضة لعملية البلعمة لكنها مقاومة للانحلال Degradation والتحرر للدورة الدموية بواسطة الحويصلات Exocytosis ولذلك بالامكان تشخيصها بشكل دقيق باستخدام الطرق المصلية (Requejo, *et al.*, 1992; Sipple *et al.*, 1984). ان كفاءة الطرق المصلية في التشخيص متباينة ونظراً لكون معظم البكتريا المسببة للمرض محفظة وتتشابه في متعدد السكريد في معظمها فان التفاعل التصالبي Cross Reactivity شائع وهو مصدر للنتائج الكاذبة الموجبة False Positive في الطرق المصلية.

فالتفاعل التصالبي لمتعدد السكريد لـ *Pneumococcus* مع بكتريا *E. coli* و *H. influenzae b* سجل في دراسات كثيرة (Ginsburg, 1978; Marks *et al.*, 1982; Gray and Fedorko, 1992; Requejo, 1992).

بينما ذكر (Sipple *et al.*, 1984) أن فحص Latex من افضل الطرق المصلية في تشخيص بكتريا *H. influenzae b* المسببة لالتهاب السحايا ولا بد من اجراء زرع للسائل المخي الشوكي لتأكيد المسبب البكتيري.

وبما ان مناعة بكتريا *H. influenzae b* خلطية فوجود الأجسام المضادة في الدم او السائل المخي الشوكي ربما يدل على اصابة حالية او اصابة جهازية سابقة وهذا ما دلت عليه الدراسة الحالية في زيادة اعداد المرضى المصابين. اذ لا بد من ان يكون العدد الميكروبي كافياً لتظهر نتيجة الزرع موجب ولا بد من سحب عينة السائل المخي الشوكي قبل اعطاء العلاج ليعطي فرصة اكبر لنمو الميكروب مختبرياً (Bingen *et al.*, 1976; Leonard *et al.*, 1984; Feldman, 1990). وفي دراسة الحساسية المناعية التشخيصية التي تمثل الافراد المرضى الذين كشف الاختبار المناعي نتائج غير طبيعية والتخصص المناعي التشخيصي والذي يمثل عدد الاشخاص الاسوياء الذي يبين الاختبار المناعي نتائج غير طبيعية.

حيث يلاحظ أن كلا من الحساسية المناعية التشخيصية والتخصص المناعي التشخيصي يكشفان بعض الشيء عن التفسير المحتمل نتيجة الاختبار قبل معرفة الحالة المرضية الجدول (14).

وجد أن مؤشرات الحساسية التشخيصية والتخصص المناعي التشخيصي اختلفت عما موجود في العينة المناعية، فقد ارتفعت قيمة الحساسية التشخيصية للضد الموضعي نسبة 52% وللجهازية 55% والتخصص التشخيصي 91% للموضعي و81% للجهازية وهذا يدل على أن الأشخاص في مجتمع الدراسة (المرضى) اظهروا المرض بنسبة كبيرة وهذا يتفق مع تعريف هذا الاصطلاح (الحساسية التشخيصية). وتعتبر النتائج غير

الطبيعية القيمة السالبة الكاذبة أما التخصص المناعي التشخيصي فهو يدل على أن الأشخاص أسوياء بنتائج اختبار طبيعية التي تمثل القيمة السالبة الحقيقية (عدم وجود أجسام متخصصة لأضداد *H. influenzae b*) (Stitis et al., 1994).

5-3-4: تركيز البروتين الكلي والموضعي لمرضى *H.influenzae b*

تبين من نتائج الدراسة شكل (7) و(8) وجود تباين في تركيز البروتين الكلي والموضعي بين حالات منخفضة ومتوسطة الى حالات عالية التركيز حيث يظهر من الشكلين اقتراب المنحني من التوزيع الجرسى الطبيعي في المرضى وهذا اعتمد على الحالة المرضية والمسبب وعند المقارنة مع السيطرة (0.15-0.45)غم/ لتر يلاحظ زيادة واضحة في تركيز البروتين الموضعي على الرغم من التفاوت في الحالات المرضية وتؤكد الاستجابة الموضعية المتمثلة بتركيز البروتين الموضعي دليلاً مؤكداً على الاصابة الحالية. في حين لم يعط البروتين الكلي مقياساً للاصابة فقد كانت معظم الإصابات ضمن الحد الطبيعي (40-80) غم/ لتر وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكرته (Al-Dahhan, 1993) اذ لم تسجل حالات الدراسة لديها أي ارتفاع في تركيز البروتين الكلي وكان ضمن الحدود الطبيعية وربما يرجع هذا الى الحالة الصحية والتغذية والاجتماعية لدى المرضى. فمن الطبيعي حصول زيادة في تركيز البروتين الكلي في المصل في الحالات المرضية نتيجة لحصول زيادة في تركيز الكلوبولينات المناعية المصلية نتيجة الاستجابة المناعية المرافقة للاصابة.

5-3-5: أصناف الكلوبولين والمتمم في مرضى السحايا

تبين تركيز اصناف الكلوبولين في مرضى السحايا باختلاف المسبب المشارك بين ارتفاع طفيف ومتوسط وعالي مقارنة بالسيطرة (الاسوياء او القيم المرجعية)الجدول (A-15) ولوحظ الاختلاف بشكل ارتفاع واضح عند مقارنة جميع المرضى بالسيطرة جدول (B-15) مما يشير الى وجود استجابة مناعية نتيجة الاصابة بالمرض.

إن الكلوبولين المناعي IgA يمنع التصاق البكتريا بالانسجة المستهدفة ويزداد معدل تركيز هذا الكلوبولين الممنع بتقدم العمر ببطئ منذ الولادة كما تعد الزيادة في تركيز الكلوبولين المناعي IgM مؤشراً لوجود استجابة مناعية اولية.

ويعد مصدر الكلوبولين المناعي IgG الام حيث يعتبر الكلوبولين الوحيد الذي يعبر المشيمة ويزداد التركيز بتقدم العمر (Goldman & Goldblum, 1977). وكانت هذه النتائج متفقة مع نتائج (Hassieb et al., 1990 ; Al-Dahhan, 1993). حيث أشاروا إلى حدوث استجابة مناعية لمختلف اصناف الكلوبولين المناعي في مصل المرضى بجمع السحايا باختلاف الفئات العمرية.

وتشير النتائج الخاصة بتركيز اجزاء المتمم C₃ و C₄ في مصل دم المرضى جدول (16 A, B) حصول ذبذبة في القيم الا انه بشكل عام يلاحظ وجود ارتفاع بسيط في التركيز في مصل المرضى وهذا يتفق مع ما ذكرته (Al-Dahhan, 1993) ويعد وجود المتمم في الدم بشكل كافي توفير الحماية المطلوبة ضد المرضى ويزداد تركيزه في حالة الالتهابات ، حيث يعتبر وسيطاً لمختلف عمليات الالتهاب ويساهم في التسريع في عملية البلعمة وتنقية الدم خلال عملية الالتصاق المناعي. تعتبر البكتريا المحفوظة حساسة للمتم بوجود الاضداد مما يؤدي الى توسط تنشيط المتمم والنتيجة البلعمة او قتل مباشر للبكتريا باعتبار ان معظم المسببات لخمج السحايا بكتريا ذات محفظة (Drogar et al., 2002).

5-3-6: المستضدية Antigenimia الموضعية والجهازية المتخصصة بـ *H. influenzae b* في مرضى السحايا

الطريقة الثانية البديلة لفحص اللاتكس هي التحري عن المستضدية الموضعية والجهازية بعد تغطية مصل الارنب المتخصص بمستضد المحفظة على كريات دم الخروف المدبوغة فقد اظهر بعض المرضى الذين اعطوا نتيجة زرع سالب نتيجة موجبة لهذا الاختبار. كما يلاحظ في الجدول (17) ظهور مجموعة أعطت نتيجة الفحص موجب للموضعي فقط او للجهازي وظهرت مجموعة أعطت نتيجة الفحص موجب موضعياً وجهازياً. وهذا شأنه شأنه الفحوص المصلية الاخرى ومنها اللاتكس اذ تنطبق مناقشة التحري عن الضدية الموضعية والجهازية لـ *H. influenzae b* على هذا الفحص كما اعطت الحساسية التشخيصية والتخصص التشخيصي ارتفاعاً للقيم فقد كانت الحساسية التشخيصية 58% للموضعي و52% للجهازي كما كان التخصص التشخيصي 74% للموضعي و91% للجهازي وتنطبق مناقشة الحساسية التشخيصية والتخصص التشخيصي للضدية الموضعية والجهازية مع هذه النتائج .

5-3-7: جدوى الطرق العملية في تشخيص السحايا في الانسان

يعد خمج السحايا من الامراض الحادة والخطيرة التي تصيب الانسان ويحدث لأسباب مختلفة فالتشخيص السريع والدقيق واعطاء العلاج المناسب سبيل لتقليل خطر الموت او التخلف العقلي. وان تمييز الأعراض والعلامات المرضية اولى طرق التشخيص ولا يكتفي المعالج بملاحظة الاعراض اذ لا بد من اجراء تأكيدي لتشخيص الحالة. هناك مجموعة من الفحوصات لتأكيد الحالة المرضية منها الدراسة السائتولوجية بتشخيص الخلايا البيض المهاجرة الى الدماغ عن طريق فحص عينة السائل المخي الشوكي والدراسة الكيمياوية بقياس تركيز البروتين والسكر ودراسة المظهر الخارجي للعينة، وصبغ العينة بصبغة كرام او الصبغة المقاومة للحامض لملاحظة نوع المسبب والزرع الميكروبي فضلا عن مجموعة الفحوص المصلية (Leonard et al., 1984; Al-Rawy and Al-Attar 2002; Tunkle & Scheld , 1993). فقد بينت نتائج الدراسة الحالية وجود تفاوت في افضلية الطرق المستخدمة بحسب الجدول (17 و18 و19 و20) .

اذ لم تعط الطريقة التقليدية في الزرع نتيجة موجبة لكل الحالات التي اعطت استجابة خلوية للخلايا البيض فلا بد من اضافة طريقة الفارينت في الزرع او غسل الخلايا او تكسيرها. فقد يكون المسبب ميكروب فاقد الجدار او متخفي في الخلايا وربما مسبب غير بكتيري كما لم تتساوى الطرق العملية المستخدمة في اعطاء النتيجة.

ولابد من القول بضرورة العمل بالطرق المصلية للتشخيص السريع وطرق الزرع الميكروبي لتأكيد الاصابة ومعرفة نوع المسبب ليتسنى للمعالج الاستمرار في العلاج او تغييره مما يعني ملاحظة السرعة في التشخيص وهذا يرجع للفحوص المصلية والدقة في التأكيد للفحص البكتريولوجي وهذا ما اتفقت عليه العديد من الدراسات والبحوث (AI- Mawla,2002;Al-Khafaji, 1999; Hoban *et al.*, 1985).

ويثبت الجدول (19) معنوية الطرق المستخدمة بحسب اختبار Z للفرق بين نسبتين تحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ حيث كانت معظم الطرق ذات معنوية ويمكن ملاحظة الفرق في استخدامها في الدراسة الحالية.

4-5: الدراسة المناعية لـ *H. influenzae b* في الأرنب

1-4-5: المناعة الموضعية والجهازية للأرنب الممنع بمستضد المحفظة

والبروتين الغشائي الخارجي لـ *H. influenzae b*

جرى استخدام العامل المناعي المساعد في تقوية الاستجابة المناعية عند دراسة المناعة الموضعية والجهازية للأرنب الممنع بمستضدات المحفظة والبروتين الغشائي الخارجي (Al-Nassiry, 2002). وبينت النتائج في الجدول (21) و(22) حصول تحفيز للاستجابة المناعية الخلوية الموضعية والجهازية متمثلاً بعيار التلازن الذي تشابه لكلا المستضدين 64 للموضعي و640 للجهازي مع اختلاف تركيز الضد الموضعي والجهازي للحيوانات باختلاف المستضد.

كما لم تحفز مستضدات بكتريا *H. influenzae b* استجابة خلوية متمثلاً باختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض غير المعنوي واختبار الجلد السالب.

إن ذرى المستضدية في متعدد السكرية لمحفظة *H. influenzae b* تعد غير معتمدة على الخلايا التائية الا ان هذه الذرى قد تختلط بطبيعتها مع ذرى ربما تكون بروتينية الطبيعة مما قد يحول نمط التنشيط المستضدي من غير معتمد الى معتمد على الخلايا مثل معظم متعدد السكريد البكتيري الذي يحفز استجابة مناعية اولية للضد قوية (Missneir and Lary , 2002 ; CDC , 1998 ; Hassieb, *et al.*,1990)

(McVernon *et al.*; 2003).

الاستنتاجات Conclusions

1. جرى تثبيت البكتريا فاقدة الجدار بوصفها مسببا مشتركا مع حالات خمج السحايا البشري فضلا عن ذات الجدار ولكن بنسب اقل، وكانت بكتريا *H.influenzae b* اكثر شيوعا، كما انها وجدت اما على سطح الخلية او في الخلية البيضاء المترشحة في سائل النخاع الشوكي .
2. إن بكتريا *H.influenzae b* ممرض للفأر الأبيض عن طريق القحف وسيرة المرض شبه حادة تتحول في غضون سبعة أيام إلى حادة وتؤدي إلى خمج سحايا كما هو الحال في البشر في حين أنها غير ممرضة عن طريق الوريد وبنفس حجم الجرعة.
3. أدى الخمج ببكتريا *H.influenzae b* لزيادة في IgM ، وبعض اصناف المتمم في المرضى.
4. أدى الخمج بـ *H.influenzae b* إلى زيادة ملحوظة في البروتين الكلي في المصل و الكلوبولين المناعي الإفرازي في الحالات المرضية.
5. جرى التثبت من أن بكتريا *H.influenzae b* تظهر حالة المستضدية الموضعية والمستضدية الجهازية والتي تعتبر أكثر جدوى في تشخيص السحايا من الضدية الموضعية والجهازية المتسببة عن *H.influenzae b*.
6. تحث *H.influenzae b* ضد موضعي وجهازي متخصص في المرضى و في الموديل المناعي في حيوان المختبر ولا تحث مناعة خلوية في حيوان المختبر.

التوصيات Recommendation

1. إضافة أوساط متخصصة بعزل فاقدة الجدار فضلا عن الأوساط الروتينية من السائل المخي الشوكي.
2. استخدام كواشف مناعية تحتوي الضد للكشف عن المستضد المتحرر من المسبب في السائل المخي الشوكي وفي الدم المحيطي (المستضدية).
3. دراسة السايبتوكاينات المتحررة في أثناء خمج السحايا ودورها في التشخيص والوقاية.
4. التمييز بين الاصابات الفايروسية والبكتيرية ودراسة الملامح المناعية لكل منهما.

Cryptic Meningitis and Some Aspects of its Local and Systemic Immunity

A thesis

Submitted to the College of Science University of
Babylon In Partial Fulfillment of Requirement for the
Degree of Ph .D. In Biology /Microbiology

By

Azhar Ammran Latif AL-Thahab

March-2006

Safar-1427

SUMMARY

Meningitis is an important and severe disease of childhood and adulthood. The culture of (sample) CSF were positive and culture negative cases.

These negative culture cases were noted in spite of the presence of signs and symptoms, this is due to mostly associated with cell wall defective bacteria (CWDB), or it might be due to previous antibiotic treatment. Thus the objective of the present work was on investigation of (CWDB) in association with meningitis together with their serologic and immunologic features.

Fifty meningitis proven cases among ninety three meningitis suspected cases were from Babylon hospital for maternity and children during a period 1-5-2004 to 1-5-2005 in olds 1 month to 5 years.

The No. 12% of cases were diagnosis as CWDB and 22% was cell wall bacteria when used routine culture and CWDB culture. *Haemophilus influenzae* b(Hib) is the most infective bacteria isolates then *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* and Yeasts were found. Local neutrophil were mostly noticed in CSF.

Haemophilus influenzae b immunity was similar in both human and lab animals. Specific antibodies were shown by using capsular and outer membrane protein (OMP) antigens in both local and systemic.

Local protein concentration were increased in patients cases but total protein is not consider as indicator for disease .There was anincreasing in IgG,IgA,IgM,C3 and C4 concentration detected by using single radial immunodiffusion test (RID)

Haemophilus influenzae B antigens had no significant effect on cellular immunity response in leucocytes inhibition factor (LIF) and skin test in animal model

Humoral antibody responses (local and systemic) were significant and feasible for diagnosis likewise antigenimia and bacteriology using Z statistics.

References المصادر

- Ahmed, H.; Hickey, S. M.; Ehertt, S. (1996). Csf values in the term neonate. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15: 298-303.
- Al-Dahhan, M. A.; (1993). Assessment of immunoglobulin and some of complement components in cases of bacterial meningitis in children in Baghdad hospital. *MSC. Thesis. Al-Mustans. Univ. Iraq.*(In Arabic).
- Al-Dalla, F. J.; Al-Mawla, S. and Salih, A. I. (2002). Fatal meningitis due to multi-drug –resistant . *Salmonella typhimurium*. *Al-Anba. Med. . J.* 4(1): 70-72.
- Al-Khafaji, J. K. (1999). Pediatric bacteria meningitis in Babylon governorate. *MSC. Thesis, Bab. Univ.*(In Arabic).
- Al-Mawla, S. O. (2002). A study on the aetiology of bacterial meningitis and preparation of anti-sera for diagnostic purposes. *Ph.D. Thesis. Al-Anba. Univ.*
- Al-Nassiry, Q. N. (2002) Biology of cell wall defective microbes from persistent pyuria. *Ph.D. Thesis. Bab. Univ.*(In Arabic).
- Al-Rawi,A.(1980).Design and Analysis of Agricultural Experiments .
- Al-Rawi, A. M. and Al-Attar, H. (2002). Using of some microbiological and chemical tests for differentiation between microorganisms causing meningitis in children. *Al-Rafida. J.* 13 (1): 10-25.(In Arabic).
- Al-Shahery, M. A. N. and Shnawa, I. M. S. (1989). The immunological adjuvancity of sun flower oil. *Cair. Vet. Med . J.* 73. (2): 201-298.
- Anderson, P.; Peter, G.; Richard, B.; Leslie, H. and David, S. (1972). Immunization of human with PRP the capsular Ag of *Hib*. *J. Clin. Invest.* 51: 39-44.

- 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
- Azubuiké, J. C. (1990). Childhood bacterial meningitis in Tabuk, Saudi Arabian .Ann. Sand. Med. 10(2): 145-148.
- Bingen, E.; Lambert, Z. ; Mariani, K.; Doit, C.; Aujard, Y. and Mathien, H. (1990). Bacterial counts in csf of children with meningitis. Clin . Microb. Inefect. Dis. 9(4): 278-81.
- Bishope, MC; Dben-con, J.; Fody Ep. and et al (1985). Clinical chemistry principles, procedure and correlation, pp.181-182. The Murry printing company Philadelphia.
- Bortulussi, R.; Ferrieri, P. and Wannamake, L.; (1975). Dynamics of *E.coli* infection and meningitis in infant rats. Infect. and Immun. 22(2): 480-485.
- Boyden, S. V. (1951). Fixation of bacterial products by erythrocyte treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by anti protein sera. J. Exp. Med. 3: 107-120.
- Brown, E. J.; Hosea, S. W. and Frank, M. M. (1982). A quantitive analysis of the interaction of pneumococcal Ab and complement in experimental Pneumococcal bacteria. J. Clin. Invest. 69: 85-98.
- Brown, H. T.; Brett, I. and Peter, L.; (2003). Recovery of cell wall deficient organisms from blood does not distinguish between patients with sarcoidosis and control subjects. Chest. 123:413-417.
- Calderon, E.; Albuerne, A. ; Gonzales, S.e and Winkler, I. (1971). Cell wall deficient bacteria in meningitis. Rev. Latin.Microb. 13(2): 95-100.(Medline).

- Cantwell, A.R.(2003).Cell wall deficient bacteria in the blood of sarcoidosis patients .J.Inde.Med.Rese. To be Published.
- Carlone, G. M.; Thomas , M.; Rumschlag, H.; and Sottnek, F. (1986). Rapid micro procedure for isolation detergent insoluble OMP. from *Hib*. Clin. Microb. J. 24(3): 330-332.
- Cauwels, A.; Frer, K.; Sansano, S.; Fearms, C.; and Lanman, R. (1999). The origin and function of soluble CD in experiment bacteria meningitis. J. Immunol. 162: 4762-4772.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) (1998). *Hib* disease technical information. Morbidity and Mortality Weekly Report. United States ,47(46),993-998.
- Chiavolini, D.; Tripodi, S.; Parigi, R.; and Oggioni, M. (2004). Methods for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice- BMC. Microb . 4(36):1-10.
- Clasner, H. (1972). Pathogenicity of the L-phase of bacteria. An. Rev. Microbiol. P. 55-84.
- Clemens, S.; Azevedo, T and Homman A. (2003). Feasibility study of the immunogenicity of novel DTPW/ *Hib* (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children. Res. Soc. Bras. Med. Trop. 36(3).
- Clin, W. and Lawson, J. (1976). Effect of antibiotics on L-forms induction of *N.meningitis*. Antimicrob. Agents and Ther. 9(6): 1056-1065.
- Cruickshank , R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). Medical microbiology. Vol.2. 12th ed, P. 459. the English language book society. London.
- Dawed, KM. and Al-Yas, ZA, (1990). Statistical method in agricultural researches. PP . 430-446. Al-Mous. Univ.(In Arabic).

- Diab, A.; Abdalla, H.; Shi, F. D.; Zhu, J. and Link, H.; (1999). Neutralization of macrophage inflammatory protein . 2 (MIP-2) and MIP-1 α in the CSN during experimental bacterial meningitis. *Infect.and Immun.* 67: 2590-2601.
- Djibo, S.; Nicolas, P.; Alonso, M.; Djibo, A.; Course, J and Chipnaw, P. (2003). Out breaks of serogroup meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. *Trop. Med. and Intern. Heal.* 8(12): 1118-1123.
- Domingue, G. J. (1980). Filterable cell associated cryptic bacterial forms in immunologic renal diseases. *Urol. Survey*, 30:1-4.
- Domingue, G. J. (1982). Filterable cell associated cell wall deficient bacteria in renal disease . In :Cell wall deficient bacteria: Basic principles and clinical significance. Domingue , G. J. (ed.). P.121-148. Addison Wesley Publishing Co. Reading Mass.
- Domingue, G. J. ; Woods, H. B. ; Farris, K. and Schlegel, J. V. (1979). Bacterial variants in urinary casts and renal epithelial cells. *Arch. Intern. Med.* 139: 1355-1360.
- Domingue, G. J.; Thomas, R.; Walters, F.; Serrano, A. and Heidger, P. M. (1997). Elusive bacteria in idiopathic hematuria. *J. Urol.* To be Published.
- Douglas, D.; Leenen, D. and Greenfield, R. (2004). Invasion of the CNS by intracellular bacteria. *Clin. Microb. Rev.* 17(2): 323-347.
- Douglas, H. R. (2004). Pleomorphic mammalian tumor derived bacteria. Self organize as multicellular mammalian. *Elsev. J.* 10(1016).
- Drogar, M.; Kuijper, E. J.; Dekker, N. and Dankert, J. (2002). Complement activation and formation of the membrane attack complex on serogroup B *Neisseria meningitis* in the presence or absence of serum bactericidal activity. *Infect. and Immun.* 70 (7):3752-3758.

- Ernest, J. ; Decazes, J. and Sande, M. (1984). Experimental pneumococcal meningitis role of leukocytes in pathogenesis. *Infect. and Immun.* 41: 275-279.
- Fassbender, K.; Ries, S.and Schmenk, V. (1996). Inflammatory cytokine in csf in bacterial meningitis association with altered blood. *J. Neurol. Neuros. Psych.* 61: 57.
- Feldman, W. E. (1976). Concentration of bacteria in csf of patients with bacteria meningitis. *Pediatr.* 19(70) 88: 549-52.
- Flier, M.; Geelen, J.; Kimpen, J.; Hoepelman, M. ; and Tuomanen E., (2003). Reprogramming the host response in bacterial meningitis. *Clin. Microb. Rev.* 16(3): 415-429.
- Fowler, M.; Weller, R.; Heckels, J. and Christodoulidesy M. (2004). Different meningitis causing bacteria in due distinct inflammatory response interaction with cells of the human meningitis. *Cellul. Microb.* 6(6): 555-567.
- Frei, J.; Heuck, C.; Riesen, W.and Laug; IT. (1995). Production of basic diagnostic laboratory reagents. WHO regional publication, Eastern Mealliterranean series.
- Gadoz, M.; Denis, F.; and Diop, I. (1981). Acute bacterial meningitis. *Bull W H O.* 59: 573-584.
- Garvey, JS.; Cremev, NE. and Sussdrof, DH. (1977). Method in immunology. 3th. ed. PP53-267. Addison-Wesley publishing company Inc., Reading.
- Gaudelus, J. (1994). Fever in infants under the age of 3 months without signs of focal infection criteria of therapeutic decision. (editorial). *Press Med.* 23(17): 785-787.
- Ginsburg, C.; McCracken, G.and Shueerson , R.; (1978). Association between cross reacting *E.coli* K loo and disease caused by *Hib*. *Infect. and Immun.* 22(2): 339-342.

- Goldman, A. S. and Goldblum R. M. (1977). Primary deficiencies in the humoral immunity. *Pediatr. Clin. N. Am.* 24: 280.
- Granert, C.; Abdalla, H.; Lindquist, 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.
- Gray, L.; and Fedorko, D. (1992). Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin. Microb. Rev.* 5(2): 130-145.
- Greenwood, BM.; Bradley, AK.; Cleland PG. (1979). An epidemic of meningococcal infection at Zaria . *Trans .Trop. Med.* 37: 551-562.
- Greenwood, M. J.; (1988). CNS infection. *Med. Intern.* 51: 2100-2106.
- Guldiero, M.; Amico, M.; Gorga, F.;Filippo, C. and Tortora,A. (2001). *Haemophilus influenzae* porin contributes to signaling of the inflammatory cascade in rat brain. *Infect. and Immun.* 69(1): 221-227.
- Hansman, D. (1983). Meningococcal disease in south Ausralia. *J. Hyg.* 90: 49.
- Hassieb, NM.; Massoud, MM. and Amani, IS. (1990). Study of cell mediated and humoral immunity in acute bacteria meningitis. *J. Egy. Pub. Heal. Ass.* 65(5-6): 643-55.
- Hoban, DJ. Witicki, E.; Hamnod, GW. (1985). Bacterial antigen detection csf of patients with meningitis. *Infect. Dis.* 3(5): 373-379.
- Hougs, L.; Jul, L. ; Srejpgard, A. and Barington, T. (1999). Structural requirements of the major protective Ab to *Hib*. *Infect. and Immun.* 67(5): 2503-2514.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982). *Chemistry In Practice* . PP. 1-70. Black well scientific publication.

- Kim, J. H.; Vander, C.; Mulrow, C. and Corey, G. (1989). *Staph. aureus* meningitis. Rev. Infect. Dis. 11: 698.
- Kim, J.M; Oh ,Y.K; Lee ,J.H. ;Yonn, J . ; Lee, C.H. ;and Choi,I.H.(2005).Induction of proinflammatory mediators requires activation of the TRAF,NIK,IKK and NF-KB signal transduction pathway in Astrocytes infected with *E. coli*. Briti.Soc. for Immun. Clin.. and Exp. Immunol.140:450-460.
- Kimura, A.; and Hansen, E. (1986). Antigenic and phenotypic variation of *Hib* Lps and their relationship virulence . Infect. and Immun. 51(1): 69-79.
- Kjeldsberg, CR. and Krieg, A. F. (1984). Csf and other body fluids. In Tood, Sanford, Davidsohn's clinical diagnosis and management by lab methods. Henry. J. B. (ed.). W. Saundess Co.
- Kwapinski, J. B. G. (1972). Methodology of immunochemical and immunological research PP.300. Wiley-Interscience New York.
- Landgraf, I. and Vieira, M. (1993). Biotype and serotype of *Hib* from patients with meningitis in the city of Saopaulo, Brazil, Clin. Microb. 31(3): 743-745.
- Lassiter. HA.; Wason, SW.; Seifring, ML.and Tanner, JE.; (1992). Complement factor a deficiency in the serum of neonates. J. Infect. Dis. 166: 53-57.
- Lehman, J. D.; Smith, J. W.; Miller, T. E.; and Sanford, J. P. (1968). Local immune response in experimental pyelonephritis. J. Clin. Invest. 47: 2541-2550.
- Leonard, J.; Scolea, J. ; and Dryja, D.; (1984). Quantitation of bacteria in csf and blood of children with meningitis and its diagnostic significance J. Clin. Microb. 19(2): 187-190.

- Levidioton, S.; Chanlabopoubs, K.; Vrion, G.; and Stefanous, D. (2004). Fatal meningitis due to *Listeria monocytogenes* in elderly patients with underlying malignancy. Intern J. Clin. Pract. 58(3): 292-296.
- Loeb, M. ; and Smith D. (1982). Human Ab. response to individual OMP of *Hib*. Infect .and Immun. 37(3): 1032-1038.
- MacFadin, J. E. (2000). Individual biochemical tests for identification of medical bacteria PP.57-424. 3rd ed. Lippincott Williams Wilkins, London.
- Marks, M.; Ziegler, E. and Douglas, H. (1982). Induction of immunity against lethal *Hib* infection by *E.coli*. core LPS. Clin. Invest. 69: 742-749.
- Mastroianni, C.; Lancella, L.; Mengony, F. and Ticea, F. (1998). Chemokin profiles in the csf during the course of pyogenic and tuberculos meningitis. Clin. Exp. Immunol . 114: 210-214.
- Mattman, L. H. (1993). Sarcodosis in: Cell wall deficient form: Stealth pathogens 2nd ed. Mattman , L. H. (ed). P. 187. CRC. Press. Inc. Boca Raton. Fla.
- McCoy, K. L.; and Kennedy, E. R. (1960). Autogenously vaccine therapy in *Staphylococcus* infections. J. A. M. A., 174(1): 117-120.
- McVernon, J.; Johnson, P.; Pollard, A.; Elack, M.; and Mexon, E. (2003). Immunology memory in *Hib* conjugate vaccine failure. Arch.Dis. 88: 379-383.
- Mead, R. H. (1985). Bacterial meningitis in the neonatal infect. Med. Clin. N. Am. 69: 257.
- Mehta, N.; Mrcpch, M.; and Pollard, A. (1999). Bacterial meningitis. Hos. Pharm. 6: 256-264.
- Michel, U.;Gerber, J.;Connor,A.;Bunkowsky, S;Bruck,W. ;and Philips,D.(2003).Increased activin level in csf of rabbits with

- bacterial meningitis are associated with activation of microgelia .
J. Neurochem . 86:238-245 .
- Missneir, H. and Lary, K. (2002). Control of disease attributable to *Hib* and the national immunization program. *Pediatr.* 110(4): 820-823.
- Moxon, E. R. and Ostrow, P. T. (1977). *Haemophilus meningitis* in infant rats. *J. Infect. Dis.* 135: 303-307.
- Moxon, E. R.; Zwahlem, A.; Rubin, L. G. Hoiseth, S. and Connelly, C. (1985). Pathogenesis of meningitis . Experimental studies on the molecular basis of *Haemophilus influenzae* infection. *Infect.* 12: 523-527.
- Muhe, L. and Klugman, K. P. (1999). Pneumococcus and *Hib* meningitis in a children hospital in Ethiopia . Serotype and susceptibility patterns. *Trop. Med. and Intern. Heal.* 4(6): 421-427.
- Mulder, C. J. and Zanen, A. C.; (1984). A study of 280 cases of neonatal meningitis in Netherlands. *J. Infect.* 9: 17-184.
- Musher, D.; Goree, A. and Murphy, T. (1986). Immunity to *Hib* in young adults. Correlation of bactericidal and opsonization activity of serum with Ab to PRP an LPS before and after vaccination . *J. Infect . Dis.* 15(4): 935.
- Mustafa, M.; Ramilo, O. and Olsen, M.; (1989). TNF in mediating experimental *Hib* meningitis . *Clin. Invest.* 84: 1253-1259.
- Myerowitz ,R. and Norden ,C. (1977). Immunology of Infant Rat Experimental Model of Hib Meningitis .*Infect. and Immun.* 16(1):218-225 .
- Nelsen, S.; Sealy, DD., and Schneider, EF. (1993). The aseptic meningitis syndrome. *Am. Fam. Phys.* 48:809-815.
- 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.

- Ocakton, E.; Ozyurda, F. and Akar, N. (2004). Natural immunity to *Hib* in children of Ankara, Turkey. *Pediatr. Intern.* 26:280-284.
- Pahari, A.; Pal, C.; Lyall, H. (2004). Recurrent meningitis is association with common variable immune deficiency. *Indi. Pediatr.* 1: 1152-1154.
- Paul, R. ; Koedel, U . and Pfister, H.(2003).Using knockout mice to study experimental meningitis. *Arch. Immun. Therap. Exp.* 51:315-326.
- Pediatrics and Child Health. (2001). Patients with permission from the meningitis .Research foundation of Canada. *Offic. J. Canad. Pediatr. Soc.* Vol. 6 Issu3.
- Peltola, H. (2000). World wide *Hib* disease at the beginning of the 21st century. Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine. *Clin. Microb. Rev.* 13(2): 302-317.
- Puliyel, J. M.; Aggarwal, K. S.and Abbas, F.A. (2001). Natural immunity to *Hib* in infancy in Indian children vaccine.*Intern.Res.Arch* 19: 4592-94.
- Quagliarello, V. and Scheld, WM. (1992). Bacterial meningitis pathogenesis, pathophysiology and progress. *N. Engl. J. Med.* 327-864.
- Quagliarello, V. and Scheld, W.M. (1997). Treatment of bacterial meningitis. *N. Engl. Med.* 336:708-816.
- Requejo, H. I. ; Nascimento, GM.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.

- Ring, A.; Weiser, J. N. and Tuomanen, E.I. (1999). Pneumococcal trafficking across the BBB molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* 102: 347-360.
- Roberts, M.; Stull, T. and Smith, A.; (1981). Comparative virulence of *Haemophilus* with type b or d capsule. *Infect. and Immun.* 32(2): 518-524.
- Robinson, D. (2004). Pleomorphic mammalian tumor-derived bacteria self-organize as multicellular mammalian eukaryotic like organisms morphogenetic properties in vitro possible origins and role in mammals. *Medical hypothesis.* Elsev. (Article in Press).
- Scheld, W. M.; (1980). Bacterial meningitis in the patients at risk, factors and host defence mechanisms. *A. J. Med.* 66: 193-207.
- Schnider, E. ; Volecker, G.; and Hsude, W. (1990). Age and sex dependent on phospholipids concentration in human erythrocyte. *I.Z. Med. Labo. Diag.* 31(2): 86-89.
- Schuchat, A.; Wenger, J. and Robinson, K. (1997). Epidemiology of bacterial meningitis. *Ann. Nest.* 55: 79-91.
- 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.
- Shnawa, I. M. S. and Mehdi, M. S. (2004). Mucosal agglutinating Ab. to the antigen of bacteria associated with urinary tract infections in human adults. *Bab. Univ. J.* 19(3): 24.
- Shnawa, I. M. S. and Al-Shahery, M. N. (2001). Potentiation of the immunostimulant effect of tetramizol. *Iraq. J. Sci.* 42(1): 38-48.
- Shnawa, I. M. S. and Abid, F. G. (2005). The role of carbohydrate binding complement components. The lactins in plotting the

- immunophylytic tree of vertebrate. Al-Qady. Sci. J. of Vet. Med.4(1):(1-5).
- Shnawa, I. M. S. and Al-Amedi, B. (1998). Bacterial antigen profile in adult csf. Iraq. J. Biol. Sci. 17:5-65.
- Shnawa, I. M. S. and Al-Gebori, H. S. H. (1998). Bacterial antigen profiles in pediatric csf. Bab.Univ. J. 3(3): 276-280.(In Arabic)
- Shnawa, I. M. S. and Al-Saadi, M. A.; (2002). Gut mucosal immunoglobulin separation practical characterization and utility as infection probe. Iraq.J. of Microb. 13(3).
- Shnawa, I. M. S. and Thewaini, Q. N.A. (2002). Lapin mucosal humoral versus systemic humoral and cellular immune response post to intracellular administration of heat killed *C.fetus* J. Bab. Univ. 7(3): 538-543.
- Shnawa, I. M. S. and Thewaini, Q. N.A. (2001). Benzimidazol carbamate pesticide pollution immunology: 1-the benomyl dose dependent humoral immune suppression of rabbits immunized with egg albumin combination. J. Bab. Univ. 6(3): 401-406.
- Sipple, J. E.; Girgis, N. I.; Prato, CM. and Edwards, EA., (1984). Detection of *N.meningitis*, *Hib* and *St.pneumoniae* antigen in csf by ELIZA.Assay.Clin. Microb.J.20(2):259-265.
- Skoog, W. A. and Beck, W.S. (1956) Studies on the fibrinogen dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leucocytes blood. J.Hematol. 11: 466.
- Smith, R.; Smith, D.; and Averill, D. (1973). Production of *Hib* in infect rats by intraperitoneal inoculation. Infect. and Immun. 8(2): 278-290.
- Soberg, M. ; (1969). In vitro migration inhibition of peripheral blood leucocytes in delayed type hypersensitivity. Acta. Medica. Scand 184:13-25.

- Spach, D. H. and Jakson, L. A. (1999). Central nervous system infections. *Neuro. Clin . J.* 17(4): 711-728.
- Stansfield , WD.(1981).Serology and Immunology, A Clinical Approach ,pp347.Mac Cmillan publishing company Inc, New York.
- Stitis, DP.; Terr, AI.; Parslow, TG. (1994). Basic And Clinical Immunology. Prentic-Hall international Inc, London.
- Suzuki, T.; isnicuro, T.; and Shimbo, T. (2003). Transient elevation of WL-16 levels at the initial stage of meningitis in children. *Clin. Exp. Immun.* 131: 484-489.
- Svanborg-Eden, C.; Kulhary, R.; Martid, S. (1985). Urinary immunoglobulin in healthy individuals and children with acute pyelonephritis. *Scand. J. Immunol.* 21: 305-313.
- Tompkins, W. A.; Schultz, R. M. ; and Rama, V. S. (1973). Depressed cell and mediated immunity in newborn rabbits bearing Fibroma virus induced tumors. *Infect. and Immun.* 7(4): 613-619.
- Tunkel, A. and Michel, W. (1997). Issue in the management of bacterial meningitis. *Am. Fam. Phys.* 56(5).
- Tunkle, A, and Scheld, M. (1993). Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis . *Clin. Microb. Rev.* 6(2): 118-136.
- Vanalphen, L.; Casngaut, D. A.; Duim, B. and Bowler,L,D., (1997). Differences in genetic diversity of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* from various disease. *Microbiol.* 143: 1423-31.
- Verduyn, F. ; Voss, ; Kuijper, Ed.; Gelinck., L.and Hoogerbrugge, P. (2004). Detection of the *Candida* antigen mannan in csf from patients suspected of having meningitis. *J. Clin. Microb.* 42(2): 867-870.

- Walter, J. B.; Talbort, L. C. ; Gradener, H. A.; Halloran, P. F. (1996).
Walter and Israel General Pathology. 7th. Ed. Churchill-Livingston, New York, PP. 154-196.
- Wispelwey, B.; Hansen, E. and Scheld, M.; (1989). *Haemophilus influenzae*, OMP induced BBB permeability during experimental meningitis. *Infec. and Immun.* 57(18): 2559-2562.
- World Health Organization (WHO) (1980). Mannaal of Basic Techniques For Health Lab. pp. 339-347.
- World Health Organization (WHO) (1999). Laboratory methods for diagnosis of meningitis caused by *N. meningitis* ,*Hib* and *S.pneumoniae* .Community Disease Control. 1-48.
- Zhang, JA. and Tuomanen, E. (1999). Molecular and cellular mechanisms for microbial entry into the CNS. *NeuroVirolo.* 5: 951-603.