Detection of Neisseria meningitidis in blood samples by PCR technique and bacterial Culture

الكشف عن بكتريا Neisseria meningitidis في عينات الدم باستخدام تقنية الـPCR والزرع البكتيري

رنا عبد الحمزة عبد الزهرة * أ.م.د.هيام عبد الرضا العواد
جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة –قسم علوم الحياة
*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

الخلاصة

يعد مرض السحايا من الامراض المهمة والمثيرة للانتباه اذ تعطي بعض الحالات المرضية نتيجة زرع سالب على الرغم من وجود الاعراض السريرية والاستجابة الالتهابية وقد يعود السبب الى العلاج المسبق بالمضادات الحيوية ، لذا تم في هذه الدراسة تسليط الضوء على تحديد الدقة التشخيصية والفائدة السريرية للطرائق المستخدمة في الكشف عن بكتريا *Neisseria meningitidis* في عينات الدم .

فقد تضمنت الدراسة الحالية 50 حالة مشكوك بإصابتها بالتهاب السحايا او بتسمم الدم من كِلا الجنسين وبأعمار من40 يوم الى 14 سنة للمرضى المراجعين لمستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الحسين التعليمي والذين تم تشخيصهم سريرياً من قبل الاطباء الاختصاصيين في المستشفى اذ سحبت عينة الدم للأشخاص قيد الدراسة الراقدين في وحدة الطوارئ او وحدة العناية المركزة Intensive care unit(ICU) او وحدة الامراض الانتقالية .

تم زرع عينات الدم في الاوساط التقليدية ،كما تم استخلاص الـ DNA البكتيري من عينات الدم لغرض الكشف عن وجود الجين *ctrA* باستخدام تقنية الـ PCR .

اظهرت نتائج الدراسة الى ان الطريقة الزرعية الروتينية اعطت نتيجة فحص بكتيريولوجي سالب بنسبة 0.0% في عينات الدم في حين عند استخدام تقنية الـ PCR بلغت عدد الحالات المشخصة لوجود جين البكتريا 15حالة (30.0%) من مجموع عينات الدم .كذلك اظهرت النتائج ارتفاع حالات الاصابة بمرض السحايا المتسبب عن بكتريا *N. meningitidis* لدى الذكور مقارنة بالإناث اذ بلغ مجموع حالات الوجود في عينة الدم للمرضى الذكور بطريقة الـ PCR تسع حالات (16.1%) وللإناث ستة حالات (13.6%) .

وفي ضوء ما قدمته نتائج الدراسة نستنتج ان تقنية الـ PCR هي الطريقة الأكثر فائدة في تشخيص البكتريا في عينات الدم لحالات مرضى السحايا المشكوك فيها .

Abstract :

The Meningitis of important disease and controversial attention as it gives some conditions as a result of culture negative in spite of the presence of symptoms and clinical inflammatory response was due to the treatment pre- antibiotic , so it was chosen this study to shed light on identifying diagnostic accuracy and clinical benefit of the methods used to detect for *Neisseria meningitidis* bacteria in samples of blood .

Included the current study, 50 cases of suspicious infected with meningitis or septicemia from both sex and by age from 40 day to 14 year outpatient hospital Karbala education for children and Hussein Hospital of education and who have been diagnosed clinically by specialist doctors at the hospital since collected samples of blood were withdrawn for the same people under study and admitted to the emergency unit or intensive care unit (ICU) or transitional diseases unit. blood samples were cultured in traditional media, as well as the DNA was extracted from bacterial samples of blood for the purpose of detecting the presence of the *ctrA* gene using a technique the PCR.

The study results showed that the routine culture method gave the bacteriological test result negative rate of 0.0% for blood samples while when using the PCR technique was the number of cases diagnosed to the presence of bacterial gene 15 cases (30.0 %) of the total blood samples . well as the results showed high incidence of bacterial meningitis disease caused by *N. meningitidis* among males than females , with total cases of the presence in the blood sample of

male patients by the way of PCR were nine cases (16.1%) and females six cases (13.6%), In light of the presented results of the study conclude that the PCR technique is the way to the most useful in the detection of bacteria in blood samples of patients with meningitis cases questionable.

المقدمة :

على الرَغم من تحسن نظام العناية الصحية ، يبقى مرض التهاب السحايا Meningitis من الأمراض المُعدية الطارئة المهددة للحياة [1]، أغلب العدوى تحدث للأطفال الرضع وقد تنشأ كذلك لدى الأطفال الأصحاء ومن هم في سن المراهقة وكذلك البالغين[2] ،قد يؤدي المرض إلى الشلل والصمم وضعف العضلات والتخلف العقلي والصحي ويعد الإنسان الضعيف مناعيا أكثر تعرضا للمرض[3].

يعرف التهاب السحايا بأنه التهاب السائل النخاعي الشوكي والأغشية الرقيقة المحيطة بالدماغ والحبل الشوكي(النخاع) وتدعى هذه الأغشية بالسحايا Meningis [4] . ان المسببات الأكثر حدوث وتردد لالتهاب السحايا البكتيري لدى الأطفال وصغار السن بعمر ثلاثة أشهر او اكثر تشمل كل من بكتريا النيسيرية السحائية *Neisseria meningitidis* ،العقديات الرئوية *Streptococcus pneumonia* (pneumococcus) والمستديمة النزلية *Haemophilus influenza* type b(Hib)، فضلا عن ان أغلب الدراسات تشير الى ان بكتريا *N. meningitidis* هي العامل الممرض الرئيسي لالتهاب السحايا بين الاشخاص الذين يتواجدون ويعيشون في نفس المكان[5,6] ومسببة بما يقارب 1.2 مليون حالة لالتهاب السحايا البكتيري والتعفن للدم عالميا[7] و135000 حالة وفاة كل سنة [8] .

تأتي اهمية هذه البكتريا لدورها الممرض للإنسان الذي يعد المستودع الطبيعي الوحيد لها فهي تستوطن البلعوم الأنفي وتصيبه عرضيا بنوعين رئيسيين من الأمراض هما التهاب سائل النخاع الشوكي (Cerebrospinal meningitis) وتسمم(تعفن) الدم بالمكورات السحائية (Meningococcal septicemia)، الإصابة عادة تكون غير متكشفة (كامنة) وفي بعض الحالات تنشأ التهابات موضعية تظهر بشكل التهاب الأنف والبلعوم، يعود ذلك لامتلاك البكتريا للعديد من عوامل الفوعة منها قدرتها على انتاج السموم الداخلية (Endotoxins) التي تتحرر بتحللها الذاتي [9] فضلا على انتاج العديد من الأنزيمات [10].

إن الكشف عن المرض المؤكد يتطلب عزل بكتريا*N. meningitidis* من مناطق تكون في العادة معقمة طبيعيا من أي وجود بكتيري والطريقة النموذجية تتم بعزلها من سائل النخاع الشوكي(Cerebrospinal fluid(CSF او الدم[11] ، إلا انه قد يكون من الصعب الحصول او منح عينة الـ CSFخصوصا من الرضع الصغار، أو قد تعطي عملية البزل الظهري القطني(Lumber panctuar)(أي عملية سحب عينة الـ CSFبطريقة وخز المنطقة القطنية) دلالة خاطئة ومؤشر عكسي بسبب ارتفاع الضغط داخل القحف[12].

ولأنه اصبح من الصعوبة المتزايدة اعتماد تشخيص اصابات المكورات السحائية بواسطة الطرق الزرعية التقليدية[13] ، فقد تم ادخال وتطوير طرق تعتمد على كشف DNA المكورات السحائية من عينات الـ CSF،الدم وأي عينات سريرية اخرى ومنها طريقة تفاعل البوليمرات المتسلسل(Polymerase chain reaction) (PCR) اذ تتلخص فائدتها الرئيسية بأنها تسمح لكشف بكتريا *N. meningitidis* من العينات السريرية التي لا يمكن الكشف فيها عن البكتريا بطريقة الزرع وبالذات عند تعاطي المريض المضادات الحيوية قبل الحصول على العينة للزرع ، وحتى في حالة كون البكتريا فاقدة لحياتها بعد المعالجة بالمضادات فأن الـPCR لم يزل يستطيع كشف DNA البكتريا ، وبسبب شدة المرض بالمكورات السحائية فمن الحاجة الملّحة معالجة المريض في أقرب وقت حالما يتم الشك بالعدوى وأن لا يتم التأخر للحصول على نتائج المختبر او الزرع[14].

ان الدراسات المُجرآة في العراق حول هذا الموضوع قليلة وخصوصا عن البكتريا*N.meningitidis* والكشف عنها بطريقة الـ PCR فمن هنا جاءت دراستنا .

طرائق العمل :

1- جمع العينات Specimens Collection

جمعت العينات من مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال ومستشفى الحسين(ع) وللمدة الزمنية من 1-12-2012 ولغاية-2013 1-5،اذ شملت عينات الدراسة 50 عينة دم blood ومن كِلا الجنسين لغرض مقارنة الاصابة بين الذكور والإناث لمرضى مشكوك بإصابتهم بالتهاب السحايا بناءاً على التشخيص السريري الأولي من أعراض وفحوصات طبية تجرى من قبل الطبيب المختص وبأعمار من40 يوم الى 14 سنة . تم سحب 2.5-3 مل من الدم الوريدي بواسطة محقنة طبية بعد تطهير المنطقة بالايودين ثم بالكحول 70% ومُنع لمس المكان بعد تطهيره وقسمت عينة الدم الى:

- 1 مل تم وضعه في أنابيب مانعة للتخثر EDTA اذ تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم وحفظت في التجميد ومن ثم نقلت في صندوق مبرد الى مختبر الدراسات العليا-قسم علوم الحياة-كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة كربلاء لإجراء الفحوصات الجزيئية لها.
- تم حقن 1-2 مل في انابيب الزرع الحاوية على وسط مرق نقيع القلب و الدماغ بعد تدفئة الانبوب بوضعه في الحاضنة او تركه لفترة لحين الوصول الى درجة حرارة الغرفة وتم تعقيم غطاء الانبوب جيداً بالأيودين قبل الحقن. كانت كمية الدم المطلوبة للمزرعة بنسبة 10:1 من كمية المستنبت السائل وتم تجهيز10 مل من المستنبت للأطفال بعمر اقل من سنة و20مل للأعمار

الأكثر من سنة. استخدمت هذه الكمية لإجراء الفحوصات البكتريولوجية اذ تم إجراءها في مختبر البكتريا التابع لمستشفى كربلاء التعليمي للأطفال.

2- فحص العينات processing of samples

A-طرائق الزرع الاولية والثانوية والتشخيص primary culture , subculture and identification

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

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

واستمر التحضين في الحالات السلبية لمدة سبعة ايام[15].

تؤخذ مستعمرة واحدة نقية من كل نمو موجود على الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي او الثانوي وتشخص مبدئياً اعتماداً على الصفات الشكلية المتضمنة حجم المستعمرات ولونها و حافاتها وارتفاعها ثم دراسة صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة غرام(Gram stain) من حيث شكل الخلايا ولونها و تجمعها، وتعتمد تقنيات مايكروبايلوجية قياسية معتمدة من الدليل المختبري لمنظمة الصحة العالمية WHO لتشخيص التهاب السحايا البكتيري، بعد ذلك يتم تشخيص العزلات اعتماداً على كتاب بيرجي الخاص بتشخيص البكتريا Bergy's manual for determination bacteriology [16].

B- الفحوصات الجزيئية Molecular tests

1- استخلاص الـ DNA

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

2- التوصيف الجزيئي للجين المدروس

***الجين المشمول بالدراسة**

تعد محفظة المكورات السحائية عامل فوّعة شديد الخطورة في نشوء امراضية البكتريا،اذ يعتمد غزو البكتريا للكائن الحي بشدة على وجود معقد الجين المحفظي المشفر للعوامل الضرورية المعبّرة عن كل من الزمر المصلية (serogroup) A،B،C،E29،W135،X،Y وZ و يعد الجين(*ctr A*) هو الجين المشفر لبروتين الغشاء الخارجي المحافظ المشترك في نقل مادة عديد السكريد المحفظي ، والذي لم يدرس على المستوى الجزيئي [17].

***اختيار البادئات**

تم اختيار البادئات Primers وكما موضح في الجدول رقم (3-4) لغرض أجراء الكشف الجزيئي على الجين المدروس [20,19,18]

جدول (3-4) يوضح البادئات المستخدمة في الكشف الجزيئي عن الجين المدروس

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

***تخفيف البادئات**

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

3- تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل لجين *ctr A* الخاص ببكتريا *N. meningitidis*

Polymerase Chain Reaction (PCR) for *ctr A* gene

تم استخدام مواد الكشف الجزيئي(PreMix) المضاف لها Tamplete DNA والـ Primer باستخدام تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل للعينات المدروسة وكما ورد في تعليمات العدة لشركة Bioneer.

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

جدول (3-5) يوضح برنامجTouch down المستخدم للكشف عن الجين *ctrA*

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

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

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

1- اكاروزAgarose

2- محلول بفر المنظم 10X TBE buffer solution

3- بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

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

*** خطوات الترحيل الكهربائيProtocol of Gel Electrophoresis**

- **تحضير جل الاكاروز**

تم إذابة 2غم من الأكاروز في 100مل من 1 X TBE بواسطة تسخين المزيج الى درجة الغليان باستخدام صفيحة حرارية الى ان تم اذابة كل دقائق الجل اذ يبدو المزيج رائق من دون أي دقائق عالقة في المسحوق,بعدها تم اضافة 2 مايكروليتر من بروميد الاثيديوم Ethidium bromide الى سائل الاكاروز و حرّك السائل مع تجنب حدوث فقاعات وصُب المزيج في صفيحة الاسناد tray وبعد غمس المشط comb قرب احدى نهايتي الصفيحة , ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة , تم ازالة المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة , وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غُطيت ببفر الترحيل 1X TBE وعلى ارتفاع (1) ملم فوق سطح الجل .

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

تم تحميل 4 مايكروليتر من الـ DNA ladder مع 10 مايكروليتر من نواتج الـ PCR في جل الاكاروز 2% (1X TBE buffer) اذ تم الترحيل على طاقة كهربائية مقدارها 70 فولت ولمدة 45 دقيقة ،صُبغ الجل بصبغة بروميد الاثيديوم السائلة وبكمية 2 مايكروليتر، تم مشاهدة الحزم بواسطة مطياف الاشعة الفوق البنفسجية UV transiluminater وتم تصويرها باستخدام كاميرا رقمية dijital camera [22].

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

النتائج والمناقشة:

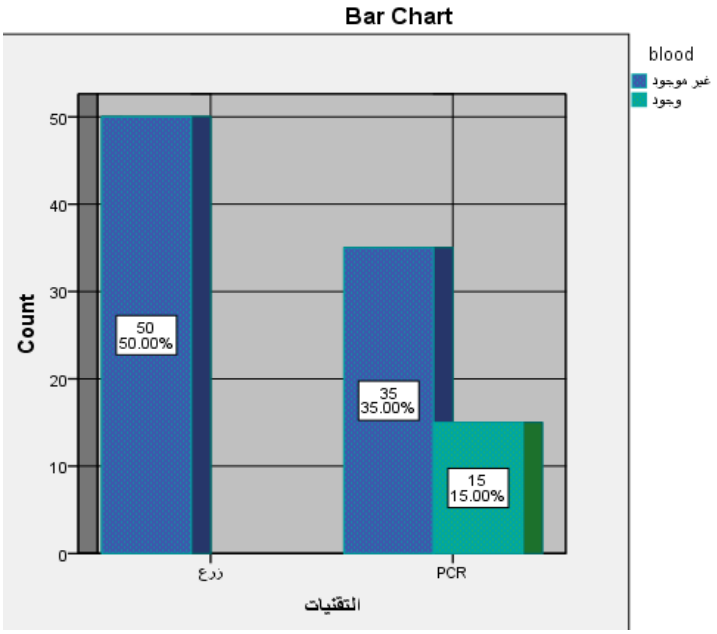
1- تشخيص بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـ PCR

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

جدول (1)نسب وجود او عدم وجود بكتريا*N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـPCR

التقنيات	عينات الدم			
	وجود		عدم وجود	
	العدد	النسبة	العدد	النسبة
الزرع	A 0	%.0	A 50	%100.0
PCR	B 15	%30.0	B 35	%70.0
الكلي	15	%15.0	85	%85.0

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



شكل(1) النسبة المئوية للكشف عن البكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بطرائق الزرع البكتيري والـ PCR .

بينت نتائج الدراسة الحالية ان عدد الحالات المشخصة للمرض بتقنية الـ PCR التي سببتها بكتريا *N. meningitidis* من مجموع 50 عينة دم بلغت 15حالة (30.0%) وقد تقاربت هذه النتيجة مع ما ذكر Seward وTowner [23] اذ بلغت عدد حالات الكشف لديه بتقنية الـ PCR للبكتريا قيد الدراسة في عينات الدم 14 حالة ،وكذلك Pollard وآخرون [24] سجلت عدد حالات الكشف لديه 10حالات من مجموع 11حالة بتقنية الـ PCR ،وأشار الباحث الى ان ادخال اختبار الـ PCR السريع والحساس للكشف عن مرض السحايا بالمكورات السحائية في عينات الدم يمثل تقدم هائل وفي الوقت المناسب لتشخيص المرض .

وأكدت [25] ان معدل عزل المكورات السحائية من مستنبت الدم يقل من نسبة 50% الى اقل من5% ، ووصف Trainor وآخرون [26] طريقة الزرع بأنها مستهلكة للوقت اذ تحتاج على الاقل 24 ساعة قبل الحصول على اية نتيجة وتنخفض حساسيتها بشكل ملحوظ في الحالات التي أُخذ فيها العلاج المسبق .ان ظهور نسبة عالية من النتائج السالبة للزرع البكتيري قد يعود الى ضعف حساسية الطريقة فضلاً عن الظروف الصعبة التي تحتاجها البكتريا للنمو في البيئات الزرعية وهي صعبة الانماء (Fastidious)وتحتاج وقت وجهد كبيرين[27] .

ويؤدي اضافة التراكيز العالية من المادة الكيميائيةSPS الى الاوساط الزرعية السائلة الملقحة بعينة الدم الى تثبيط نمو بكتريا *N. meningitidis* اذ تكون حساسة جدا لها فلابد ان لا يتجاوز محتوى الـSPS عن 0.025% [29,28].

وتستطيع ان تكمل الاختبارات القائمة على تفاعل البوليمر المتسلسل السريع الاجراءات المختبرية القياسية لان هذه الاختبارات اقل تأثراً بالعلاج المسبق بالمضادات الحيوية ويجري استخدامها على نحو مطرد الزيادة ، وتم التأكيد على ذلك في دراسة [31,30].

أشار [32] الى ان العديد من مرضى التهاب السحايا لا يمكن اجراء عملية وخز المنطقة القطنية(LP) لهم بسبب ارتفاع الضغط داخل القحف او في حالة رفض الاهل اجراء العملية لأطفالهم ،في مثل هذه الحالات تكون الاختبارات الجزيئية لعينات الدم

هي الطريقة الافضل وذات حساسية ودقة اكثر للتشخيص السريري .وأكد ذلك Newcombe وآخرون [31] في دراسة سابقة على ان التطبيق الواسع لهذه الاختبارات المعتمدة على الـ DNA يسمح بزيادة عدد الحالات المشخصة لمرض السحايا بالمكورات السحائية الى حوالي 60% بدون الحاجة الى سحب عينة السائل النخاعي الشوكي(CSF) .

2- تأثير الجنس في نسب وجود او عدم وجود بكتريا*N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـPCR

عند دراسة تأثير الجنس على نسبة الاصابة بالبكتريا هناك تغايرات واضحة للذكور عن الإناث في عينات الدم ،اذ ابدت النتائج ان مجموع حالات الوجود في عينة الدم للذكور بطريقة الـ PCR تسع حالات(16.1%) وللإناث ستة حالات (13.6%) الشكل(2) و(3) ، ووجدت فروقات معنوية دلالة على المقدرة الكبيرة للاختبار في تشخيص البكتريا في عينات الدم للذكور ($P<0.05$) عند المقارنة مع القدرة التشخيصية للاختبار في عينات الدم للإناث اذ بلغت (.001) و(.008) على التوالي (جدول2) .

جدول (2) تأثير الجنس في نسب وجود او عدم وجود بكتريا *N. meningitidis* في عينات الدم بالطريقة التقليدية وبتقنية الـPCR

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

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

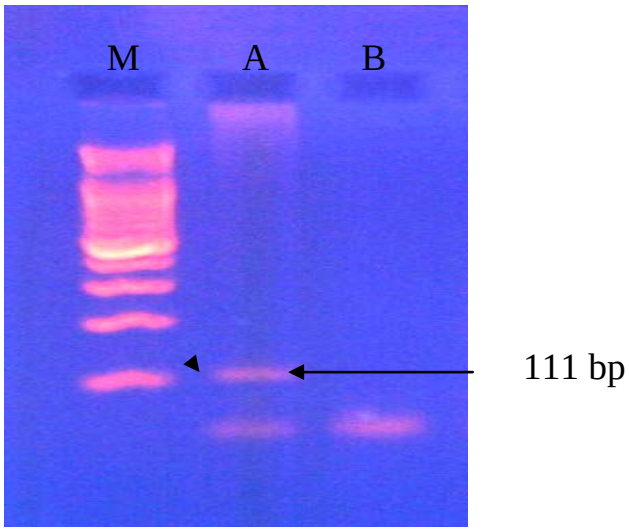
تشير نتائج هذه الدراسة جدول(2) الى ان نسبة تشخيص البكتريا في الذكور جاءت اعلى من الإناث وقد اتفقت مع ما توصل اليه الباحث AL-Rawazq [33] من ان الذكور اعلى اصابة من الإناث اذ بلغت عدد الحالات للذكور 41 حالة (68.33%) وللإناث 19 حالة (31.67%) وان الاختلاف في نسب الكشف او عدد الحالات المشخصة اذ كانت اقل في دراستنا الحالية بسبب اختلاف حجم العينة المدروسة ، وكذلك الباحث AL-Janabi وآخرون [34] تمكن من عزل البكتريا بنسب اعلى في الذكور من الإناث بلغت 1:1.24 ، اما الباحث Hassan [35] فقد استنتج انه يمكن ان يكون للجنس تأثير في نسب وجود البكتريا اذ بلغت نسبة الذكور الى الإناث 1:1.5 ،قد يعزى السبب في نسب الاختلاف بين الجنسين الى اختلاف مقدرة العوامل الموجودة داخل المضيف على الاتصال بالعوامل المسببة للمرض ،وقد ينسب السبب في ارتفاع نسبة الاصابة لدى الذكور الى الجانب المناعي فربما يكون نقص البروبردين (المنشط للمسلك الثالث للمتمم) هو خلل مرتبط بالكروموسوم X وعند التحري عن نقصه يجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار عندما يكون للعائلة تأريخ لمرض السحايا بالمكورات السحائية حاصل بموجب النوع المرتبط بالكروموسوم X.

لكن نتائج هذه الدراسة تناقضت مع نتائج دراسة شريف وآخرون [36] التي بلغت فيها حالات الاصابة في الذكور ست حالات (46.15%) بينما كانت سبعة حالات (53.84%) لدى الاناث ،وأوضح ان سبب الاختلاف قد يعود الى اختلافات بايولوجية وهرمونية بين الإناث والذكور.

3-الدراسة الجزيئية Molecular Study

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

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



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

تمثل البادئات primers المستخدمة لغرض اجراء الكشف الجزيئي على الجين *ctr A* المشفر لبروتين الغشاء الخارجي المحافظ المشترك في نقل مادة عديد السكريد المحفظي لبكتريا *N. meningitidis* في الدراسة الحالية هي ذاتها المستعملة في فحوصات الـ PCR المضاعفة multiplex لكشف مرض التهاب السحايا اذ يمثل الجين المدروس المستخدم في تقنية الـPCR الجين الفريد والخاص لبكتريا المكورات السحائية وهو عام لكل المجاميع المصلية التابعة للبكتريا [37] . وجرى تقييم البادئات من خلال مفاضلات رئيسية تمت داخل المختبرات المعتمدة على تشخيص بكتريا المكورات السحائية بتقنية الـ PCR وكذلك في دراسات اخرى أفضت الى نتائج مُرضية [38,19] .

المصادر :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16- **Popovic, T.; Ajello, G. and Facklam, R.(1999).**WHO laboratory Manual for the diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Geneva: World Health Organization.

17- **Corless, C.E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Fox, A.J. and Kaczmarski, E.B.(2001).**Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*.;39:1553–1558.

18- **Taha, M. K.; J. M. Alonso; M. Cafferkey; D. A. Caugant; S. C. Clarke; M. A. Diggle; A. Fox; M. Frosch; S. J. Gray; M. Guiver; S. Heuberger; J. Kalmusova; K. Kesanopoulos; A. M. Klem; P. Kriz; J. Marsh; P. Molling; K. Murphy; P. Olcen; O. Sanou; G. Tzanakaki and U. Vogel.(2005)** . Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol*. 43:144–149.

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

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

21- **ابو المعالي ،حسن محمود .(2013).** برنامج Touch down, اتصال شخصي .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

36- **شريف ،أديبة يوسف .(2008).** عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب السحايا من الاطفال . جامعة الموصل /كلية العلوم /قسم علوم الحياة .مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 13(3) .

37- Corless, C.E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Fox, A.J. and Kaczmarski, E.B.(2001). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*.;39:1553–1558.

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