تقييم بعض الواسمات المناعية لبعض الاشخاص المصابين بحمى التيفؤيد في محافظة ديالى

1- **فاطمة عامر عبد الجبار** ,المعهد الطبي بعقوبة , هيئة التعليم التقني
2- **د. عباس عبود فرحان** ,قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة,جامعة ديالى
3- **د. محمد عبد الدايم صالح**. كلية العلوم , قسم علوم الحياة,جامعة ديالى

الخلاصة

هدفت الدراسة تقييم بعض الواسمات المناعية لبعض المرضى المصابين بحمى التيفؤيد في محافظة ديالى.. تم جمع (74) عينة دم من المرضى المصابين بحمى التيفؤيد وكذلك تم جمع (40) عينة لاشخاص اصحاء ظاهريا تم اعتمادهم كمجموعة سيطرة , وقد استمرت الدراسة خلال الفترة المحصورة مابين شهر أيلول عام 2012 ولغاية شهر ايار من عام 2013 .اذ بينت نتائج الدراسة ان هناك ارتفاعا معنويا في نسب الكلوبيولينات المناعية الثلاثة بالنسبة للمرضى مقارنة بالأصحاء وكانت نسبة ال (IgG)(1743 .228 mg/dl) في مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة (1093.120 mg/dl) وكانت نسبة IgM (212.605mg/dl) بالنسبة لمجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة (147.640 mg/dl) ونسبة IgA (276.259 mg/dl) في مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة (142.118mg/dl).

كذلك استهدفت الدراسة قياس عوامل المتمم الثالث والرابع باستخدام طريقة الانتشار المناعي في المرضى المصابين بحمى التيفؤيد اذ بينت نتائج الدراسة ارتفاعا في مستوى المتمم الثالث (C3) في مجموعة المرضى وبمعدل (109.019 mg/dl) مقارنة بمجموعة السيطرة (108.475mg/dl) وهذا دليل على تحفيز الاستجابة المناعية المتأصلة للمرضى المتمثلة بنظام المتمم , كما بينت نتائج الدراسة انخفاضا في مستوى المتمم الرابع (C4) في مجموعة المرضى وبمعدل (31.627mg/dl) مقارنة بمجموعة السيطرة (34.715mg/dl) وهذا دليل على تاثر مناعة المريض استجابة للإصابة. مما تقدم فان نتائج الدراسة أثبتت تاثر المناعية الخلطية (IgG,IgM.IgA) والمناعة المتاصلة (C3,C4) نتيجة الاصابة.

كلمات الدالة:- ,الواسمات المناعية , المناعة الخلطية , المناعة المتاصلة , حمى التيفؤيد

Study some Immunological paramrters in some infected patients with typhoid fever in diaylia governorate

1- Fatima A. al-gabar - Baquba medical Institute, minisior of technical institute.

2- Dr. Abbas A. Frhan ,department of Biology ,College of Education fot Pure Science ,University of Diyalia.

3-Dr.Mahmad A. Salah, department of Biology ,College of science, University of Diyalia

Received 18 May 2013 ; Accepted 17 September 2013

Abstract

The study aimed to evaluate some immunoglobulins for some infected patients with typhoid fever, in Diyala governorate. In which 74 blood samples were collected from patients with typhoid fever as well as (40) sample collected from apparently healthy individuals has been accredited as a control group and the study, has continued during the period between September 2012 and up to May of 2013.

From 74 sample the results of the study had showed that of the total (74) sample that there is a rise in the proportion of the level three immunoglobulin (IgG, IgM,IgA) for patients compared to control the mean of the (IgG)was (1743 .228 mg / dl) in patients group compared to control (1093.120 mg/dl) and The mean of IgM was (212.605mg/dl) in patients group compared to control(147.640 mg/d) and the mean of IgA was (276.259 mg / dl) in the patients group compared to the control group (142.118mg/dl) .

Also the Study aimed to Measure the complement factors (C3,C4) by using the single radial immunoassay diffusion method in patients with typhoid fever where the results of the study a high level of C3 in a group of patients was increase (109.019 mg / dl) compared to control group (108.475mg / dl), and this is an evidence the innate immune response in patients represented by the complement system were stimulated in patient group. and, results of the study also showed a low level of complement (C4) in a group of patients and at a rate

(31.627mg/dl) compared to the control group (34.715mg/dl) this is an evidence that the patient immunity had affected in response to infection. From the above , the results of the study had revealed that both the Humoral immunity (IgG,IgM,igA) and Innate immunity were effected in patients with typhoid fever

Key words:-immunoglobulins, Humoral Immunity, innate immunity ,typhoid fever

المقدمة

تعد حمى التيفؤيد من الإمراض المعدية الشائعة التي تصيب الإنسان , تسببها بكتريا السالمونيلا المعوية Salmonella enterica من النوع typhi (Yoon , et al., 2009) . ومن الممكن إن تكون الإصابة ناجمة أيضا عن بكتريا Salmonella para typhi التي عادة ما تؤدي إلى مرض اقل حدة . يصاب الفرد ببكتريا التيفؤيد ويتطور فيما بعد إلى حمى التيفؤيد عن طريق ابتلاع البكتريا (American Academy of Pediatrics, 2006) , وتنتشر هذه العصيات عن طريق ابتلاع الطعام والشراب الملوث بالبكتريا (Pegues , et al.,2005).

ان حمى التيفؤيد لاتزال تسبب مشكلة صحية في البلدان النامية , لذلك يكون مرض التيفؤيد شائعا" في الإماكن او المناطق الفقيرة ولا سيما عندما يكون الماء ملوثا" بفضلات الإنسان . تكون مدة الحضانة من (4-10) يوم بعد ابتلاع الجرثومة (Bhutta, 2006).خلال هذه المدة تتحرك البكتريا وتنتقل من الأمعاء إلى الدم اذ يكون تكاثرها في الدم وتنتشر في العقد اللمفاوية والكبد والطحال وقناة الصفراء (Hermann , *et al*.,2004). قد سجلت منظمات ومؤسسات ومراكز بحوث الصحة في مختلف أنحاء العالم الكثير من التقارير والإحصائيات التي بينت عدد الأشخاص المصابين بهذا المرض , اذ تشغل قارة أسيا المرتبة الأولى في معدل الإصابات ويقع القطر العراقي ضمن هذا المعدل(WHO, 2010).

على الرغم من إن الكائن الممرض يسبب إضرارا" كبيرة للحويصلات اللمفاوية للنسيج ألطلائي في المراحل المبكرة من الإصابة الا ان الدراسات اثبتت ان الخلايا المبطنة والتي تضررت أو تحطمت يمكن تجديدها بسرعة ويكون ذلك واضح من خلال تنشيط الجهاز المناعي بواسطة الاستجابة المناعية لوجود السالمونيلا وتنشيط المناعة الخلوية (Cell-Immunity) والمناعة الخلطية (Humoral Immunity) (Anoop *et al*. , 2009 , *et*). اذ ان الخط الدفاعي الأول ضد الإصابة بالسالمونيلا يمكن تحديده من خلال تنشيط الخلايا البلعمية Macrophage (Chantal, *et al.*, 2010).

ان الاستجابة المناعية المتأصلة مهمة جدا (Innate immune response) في مقاومة الإمراض المعوية وتحفيز المناعة الخلطية . وان دور المناعة الخلطية مهما" وواضح من خلال استجابتها لمستضدات السالمونيلا (O , H) إثناء وبعد الإصابة بمرض التيفؤيد وعند اخذ اللفحات الخاصة بالتيفؤيد (Zambrano-Zaragoza , *et al*.,2009). ويمكن تحديد وقياس مستوى الكلوبيلينات المناعية الثلاثة(IgG,IgM,IgA) ومستوى المتممات(C3,C4) في الاشخاص

المصابين بحمى التيفؤيد من خلال استخدام تقنية Radial Immundiffusion plate في الاشخاص المصابين بحمى التيفؤيد وقد استخدمت هذه التقنية من قبل العالمين Singer and Plotz (Premavathg, *et al*., 1983). ونظرا لندرة الدراسات حول هذا المرض لاسيما في محافظة ديالى من حيث الناحية المناعية وبالتحديد حالة المناعة الخلطية ودور عوامل المتمم , ومدى تأثر مناعة الشخص المصاب بالمرض لذلك هدفت الدراسة تحديد المناعة الخلطية المتمثلة بالكلوبيولينات المناغية الثلاثة(IgG ,IgM, IgA) والمناعة المتاصلة المتمثلة بنظام المتممC3 و C4 في مصل المصابين بحمى التيفؤيد.

المواد وطرائق العمل

عينات الدراسة

تم جمع 114 عينة دم , (74) عينة لأشخاص يعانون أعراض حمى التايفوئيد ظاهريا استنادا إلى التشخيص ألسريري من الكادر الطبي الاستشاري في كل من مستشفى الخالص العام والمختبرات الخارجية في محافظة ديالى , و(40) عينة لأشخاص أصحاء تم اعتمادهم كمجاميع سيطرة , علما ان جميع العينات كانت لافراد عراقيين, حيث اعتمد التشخيص على الفحص ألسريري وقد استمرت الدراسة خلال الفترة المحصورة مابين شهر أيلول عام 2012 ولغاية شهر ايار من عام 2013.

قياس الكلوبيولينات المناعية IgG,IgM,IgA باستخدام تقنية Single Radial Immunodiffusion Plate

استخدمت هذه التقنية لقياس مستوى الكلوبيولينات المناعية وعوامل المتمم في مصل المرضى, اذ ان البروتين المراد قياسه ينتشر في جل الاكاروز والذي يحتوي على الجسم المضاد المتخصص والذي يشكل المعقد المناعي والذي يظهر على شكل حلقة او دائرة حول الحفر,حيث إن قطر الحلقة او الدائرة يتناسب طرديا مع تركيز البروتين المتحلل , وهذا التناسب يرتبط مع وقت الانتشار وبعد (72-96) . ساعة سيكون مربع القطر في تزامن خطي مع التركيز ويرسم منحنى القياس بالاعتماد غلى التركيز والوقت (Chetan and Anajwala ,2007).

طريقة العمل

1- استخرجت عينات المصل من التجمد (Deep freezer) ووضعت في الحاضنة لمدة 15 دقيقة .

2- تم تحضير صفيحة القياس ورفع الغطاء عنها ووضعها على مستند ثابت وتركها بدرجة حرارة الغرفة لدقائق قليلة

3- ملئت الحفر في الصفيحة بإضافة 5 مايكروليتر من مصل العينات وتترك حتى تمتصها الحفر من دون تحريك.

4- غطيت الصفيحة وتوضع في chamber رطب وتترك لمدة 72ساعة

5- تم قياس معدل الترسيب بواسطة مسطرة وتطابق النتائج مع الجدول

قياس عوامل المتمم (C3 and C4) باستخدام تقنية

Single Radial Immunodiffusion Plate

تستخدم هذه الطريقة لقياس مستوى عوامل المتمم , اذ تستخدم للتقدير الكمي لمستوى المستضدات بوساطة قياس اقطار الدوائر للمعقدات المترسبة المحيطة بعينات المستضد والتي تميز الحدود بين المستضد والضد والمعلقة في وسط الاكاروز .حيث ان ترسيب المعقد المناعي من المستضد والضد يكون اكثر حساسية , عن طريق تداخل المصل المضاد في جل الاكاروز والذي يسمح للمستضد بالانتشار حول الحفر وان أقطار الدوائر تزيد مع الوقت . (Stanley and Jacqueline,2002).

طريقة العمل :

1- استخرجت عينات المصل من التجميد (Deep freezer) ووضعت في الحاضنة لمدة 15 دقيقة

2- تم تحضير صفيحة القياس ورفع الغطاء عنها ووضعها على مستند ثابت وتركها بدرجة حرارة الغرفة لدقائق قليلة

3- ملئت الحفر في الصفيحة بإضافة 5 مايكروليتر من مصل العينات وتترك حتى تمتصها الحفر من دون تحريك.

4- غطيت الصفيحة وتوضع في chamber رطب وتترك لمدة 72ساعة

5- تم قياس معدل الترسيب بواسطة مسطرة وتطابق النتائج مع الجدول

النتائج والمناقشة

اولا - تم قياس المناعة الخلطية والمناعة المتاصلة (C3,C4) لمجاميع الدراسة بطريقة single radial immune assay diffusion وهي من الطرق المناعية المعتمدة والحساسة والدقيقة التي لاتحتاج الى اجهزة ومعدات وتستخدم لتحديد مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgG,IgM,IgA) في مصل المرضى والتي تعتمد على انتشار المستضد حول الحفر في جل الاكاروز التي تحوي على الاجسام المضادة وتكوين معقدات مناعية تترسب بشكل شعاعي حول الحفر ومن خلال قياس قطر الدوائر المترسبة يتم معرفة القدرة المناعية والمناعة الخلطية لكل مريض Stanley and Jacqueline (, 2002).

ان التفاعل بين المستضد والأجسام المضادة مهم في دفاع الجسم ضد البكتريا وسمومها حيث ان القابلية المناعية تعتمد على تمييز االمستضد بواسطة المناعة الخلطية اذ ان إنتاج الأجسام المضادة الخاصة استجابة للتعرض لمستضدات البكتريا وان الارتباط بين الأجسام المضادة والمستضد تؤدي الى تكوين معقدات مترسبة تفيد في التشخيص المختبري .(Shamsher and Madan,2007)

ثانيا - أشارت نتائج الدراسة كما مبين في الجدول (1) بان مستوى الكلوبيولينات المناعية لل IgG (1743.228 mg/dl) وIgM (212.605 mg/dl) و IgA (276.259mg/dl) كانت اعلى من مجموعة السيطرة حيث كانت مجموعة

السيطرة لل IgG (1093.120mg/dl)و IgM (147.640 mg/dl) و IgA (215.115 mg/ dl) وبعلاقة معنوية عالية عندما (P <0.001)

جدول (1) مقارنة مستوىالكلوبيولينات المناعية بالنسبة لمجاميع المرضى ومجاميع السيطرة

Group	Parameter	Number	Mean Mg/dl	ST. Deviation Mg/dl
Patient	IgG	74	1743.228	1957.9351
	IgM	74	212.605	91.7184
	IgA	74	276.259	142.1183
Control	IgG	40	1039.120	343.5782
	IgM	40	147.640	67.4659
	IgA	40	215.115	71.7951

جدول (2) قيمة (t— (test للمقارنة بين قيم الكلوبيولينات المناعية بين مجاميع المرضى ومجاميع السيطرة

	t	P-value	C.S
IgA\p—IgA\ Control	3.409	P< 0.001	HS
IgM\P—IgM\Control	5.740	P< 0.001	HS

HS (علاقة معنوية عالية)

اذ ان ارتفاع نسبة الكلوبيولينات المناعية الثلاثة مؤشرا على الاصابة بالمرض نتيجة لتحفيز المناعة الخلطية للأشخاص المرضى استجابة للمستضد الجسمي والسوطي لبكتريا *S. typhi* للقضاء على المرض والتقليل من الاصابة , ويأتي دور

المناعة الخلطية في الدفاع والحماية من خلال افراز الأجسام المضادة المتخصصة من قبل خلايا البلازما حيث تفرز في سوائل الجسم استجابة للإصابة بالمرض او الالتهاب (Pier , *et al*., 2004)

ان دور الاجسام المضادة المتخصصة مهما جدا في تحفيز مناعة الجسم ,اذ تسبب في حدوث التلازن اوالترسيب على شكل معقدات مناعية وكذلك التحفيز على البدا لعملية البلعمة من قيل خلايا Macrophage والمساعدة على تحفيز الاستجابة المناعية لمسار نظام المتمم(Janeway ,*et a*l., 2001) ففي حالة الإصابة الطبيعية للمرض فان الكشف عن الكلوبيولين المناعي IgM دلالة على الإصابة الحديثة بالمرض ويبقى لفترة محدودة تصل عدة اشهر بينما الكشف عن الكلوبيولين المناعي IgG يعني وجود اصابة سابقة بالمرض او ناتجة من اخذ اللقاح ضد المرض ويبقى لفترة طويلة تصل اكثر من سنتين (Gopalakrishnan ,*et al*.,2002; Shamsher and Madan,2007) . وكذلك ان إفراز الجسم المضاد IgA مهم جدا بوصفه الخط الدفاعي الأول ضد الإصابة في الأمعاء يفرز في جوف الامعاء ويمنع من وصول الانتجين الى الجهاز المناعي وتحطيم العامل الممرض ويوفر حماية كبيرة ضد الاصابة من خلال ارتباطه على سطح البكتريا اثناء قيامها بعملية الالتصاق والهجوم على الطبقة المخاطية للامعاء (Zambrano-.Zaragoza,2009) .

ج - اشارت نتائج الدراسة كما مبين في الجدول (3) و(4) بان مستوى المتتم رقم (3) (C3) أعلى بالنسبة لمجموعة المرضى وبمعدل (109.019 mg/dl) مقارنة بالأصحاء (108.475mg/dl) وهذا يتفق مع ماجاءت به الدراسات السا بقة (Michael , *et al*.,2004 Sulaiman ,2006).

جدول (3) مقارنة عوامل المتمم الثالث والرابع مابين مجاميع المرضى ومجاميع السيطرة

	Parameter	Number	Mean Mg/dl	Std Devition Mg/dl
Patient group	C3	74	109.019	52.7239
	C4	74	31.627	19.0447
Control group	C3	40	108.475	34.2748
	C4	40	34.715	7.3486

جدو(4) قيم t—test لمقارنة قيم عوامل المتمم الثالث والرابع لمجاميع المرضى

	t	P-Value	CS
C4 \p	14.286	P<0.001	HS
C3 \P	17.787	P<0.001	HS

كما بينت نتائج الدراسة في الجدول (3) بان مستوى المتمم رقم (4) (C4) كان في مجموعة المرضى بمعدل (31.627mg/dl) اقل من مجموعة الأصحاء (34. 715mg\dl) وهذا يفسر تثبيط الجهاز المناعي نتيجة الإصابة ودليل على أمراضية البكتريا وشدة فوعتها ومقاومة القتل المعتمد على نظام المتمم سببه شدة فوعة البكتريا اذ ان السلسلة الطويلة لمتعدد السكريات الشحمي يعطي مقاومة للبكتريا ويمنع عوامل المتمم من الاقتراب من الغشاء الخارجي (Bravo, *et al.*, 2008).

كما يبين دور نظام المتمم الذي يمثل المناعة المتأصلة غير متخصصة ودورالكلوبيولينات المناعية في القضاء على الإصابة عند وجود البكتريا في مجرى الدم حيث إن المسلك الكلاسيكي ينشط بوجود الأجسام المضادة المتخصصة المتمثلة بالكلوبيولين المناعي IgM, IgG لتكوين معقدات من الاجسام المضادة والانتجين اذ يرتبط العامل المتمم الثالث والرابع مع الجزء (Fc portion) من الكلوبيولين المناعي Ig G اوالكلوبيولين المناعي IgM لتكوين معقد مناعي مع الانتجين (Murphy, *et al.*, 2008).وكذلك دور العامل المتمم في المحافظة على الأجسام المضادة بشكلها الذائب وذلك بتحديد تكوين المعقدات المناعية المؤذية وتثبيط ترسيب الكلوبيولينات المناعية (Hannu , *et al.*, 2000).

المصادر الانكليزية

1. American Academy of Pediatrics. Pickering ,L.K., ed.(2006). Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 27th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics.
2. Anoop, S. Pulickal; Samir Gautam; Elizabeth, A. Clutterbuck; Stephen Thorson; Buddha Basynat; Neelam Adhikari; Katherine Makepeace; Sjoerd Rijpkema; Ray Borrow; Jeremy, J. Farrar; & Andrew, J. Pollard.(2009). Kinetics of the Natural, Humoral Immune

Response to *Salmonella enterica* Serovar *typhi* in Kathmandu, Nepal · Clin .vaccine immunol. 16(10): 1413–1419.

3. Bhutta, Z.A.;(2006). Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. B.M.J. 333(7558): 78 – 82.
4. Bravo, D.; Silva, C.;Carter, J. A.; Hoare, A.; Alvarez, S. A.; Blondel, C. J.; Zaldivar, M.; Valvano, M. A. & Contreras, I. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide Oantigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. Journal of Medical Microbiology. 57(8) : 938-946..
5. Chantal, G. Forest ;Elyse Ferraro; Sébastien C. Sabbagh & France Daigle. (2010). Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar *typhi* in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI).*Microbiology* 156 (12):3689-3698.
6. Chetan, C. Anajwala (2007). Radial Immuno Diffusion. R.I.D.(1). Garland Science.
7. Gopalakrishnan ,V.; Sekhar, W.Y.; Soo, E.H.; Vinsent, R.A. &Devi, S. (2002).Typhoid fever in kuala lumpur and a comparative evaluation of two commercial diagnostic kits for the detection of antibodies to *Salmonella typhi*. Singapore Medical . Journal. 43: 354-358.
8. Ghassan Mohammad Sulaiman.(2006). Immunological Study of Febrile Fever: Serum Sialic Acid, Immunoglobulin Levels (IgA, IgG and IgM), Complement Factors (C3 and C4) in Patients with Typhoid Fever and Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry. 51 (12): 2415-2418.
9. Hannu Korhonen ; P. Marnila & H. S. Gill.(2000) Milk immunoglobulins and complement factors. British Journal of Nutrition 84(1): S75-S80.
10. Heymann, DL, ed.(2004). Control of Communicable Diseases Manual. 18th edition. Washington, DC: American Public Health Association.
11. Janeway, C.A.; Travers, P. & Walport ,M. *et al* (2001). The complement system and innate immunity. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York:
12. Murphy, .J.E.; Padilla, B.E.; Hasdemir, B.; Cottrell, G.S.; Bunnett, N.W. (2009). Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. Proc. Natl. acad .sci. U S A. 20(106):17615–17622.

13. Michael, M. Glovsky; Peter A. Ward & Ken,t J. Johnson.(2004). Complement determinations in human disease. Ann. Allergy Asthma Immunol. 93:513–523.
14. World.Health.Organization.(2010).Typhoid.fever. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index/html-
15. P. Gros : F.J. Milder & B.J.C. Janssen. (2008). Complement driven by conformational changes, Nature Reviews Immunology. 8: 48-58.
16. Shamsher, S. Kanwar & Madan Lal Verma.(2007). Immunology and Medical Microbiology. Himachal Pradesh University, Summer-Hill, Shimla-171 005.
17. Stanley& Jacqueline (2002). 12. Precipitation: Laboratory Technique 12-1: Radial Immunodiffusion Test. Essentials of Immunology & Serology. Albany, New York:. 172–174
18. Pegues, D.A.; Ohl, M.E .& Miller,S.I.(2005).*Salmonella* Species including *Salmonella typhi.*In:Mondell douglas & Bennett's principles and practice of infectious. Dieseases, 6thed.Mandell,G.L.;Bennett,J.E.& Dolin,R. (editors).Churchill Livingstone.
19. Pier, G.B.; Lyczak ,J.B.& Wetzler, L.M. (2004). Immunology, infection, and immunity. ASM Press. ISBN 1-55581-246-5.
20. Premavathy Rajagopalan ;A. N. Malaviya& Kausalya Narayanan.(1983). Immunospecificities of antinuclear antibody in systemic connective tissue diseases in India. Indian. Jourinal .Medical. 77: 87-95.
21. Yoon ,H.J. ;Cho,S.H.& Kim ,S.H.(2009).A Case of Multidrug-Resistant *Salmonella enteric* Serovar *Typhi* Treated with a Bench to Bedside Approach. Yonsei. Medical. Journal. 50(1): 147–151.
22. Zambrano-Zaragoza ,J.F.; de Jesus Durán-Avelar ,M.; Rodríguez-Ocampo, A.N.; García-Latorre, E.; Burgos-Vargas, R.; Dominguez-Lopez ,M.L.; Pena-Virgen ,S,.&Vibanco-Pérez, N.(2009). The 30-Kda Band From *Salmonella Typhimurium*: Igm, Iga And Igg Antibody Response In Patients With Ankylosing Spondylitis Rheumatology (Oxford). 48(7):748-54. .