الكشف عن الحمّى المجهولة (Q Fever)عند الإنسان باستخدام اختبار تفاعل سلسلة البوليميراز (PCR)

ماهر يوسف الحوراني*

ملخص البحث :

الحمى المجهولة عبارة عن مرض جرثومي تسببه جراثيم الكوكسيلّة البورنيتيّة ، أجريت هذه الدراسة للتقصي عن وجود مرض الحمى المجهولة عند البشر في المنطقة الوسطى من القطر العربي السوري حيث تركزت الدراسة على منطقة حماه ومصياف والمناطق الواقعة بينهما وباستخدام اختبار pcr فقد تم الكشف عن وجود الكوكسيلّة البورنيتيّة العامل المسبّب لمرض الحمّى المجهولة علماً أن العينات كانت عشوائية ، وقد بلغت نسبة الانتشار (٦٨%) من المجموعة البشريّة التي شملتها الدراسة. هذه النتائج تثبت وتوثّق بالدليل وجود مسبب المرض (الكوكسيلّة البورنيتيّة) عند البشر الموجودين في منطقة الدراسة الأمر الذي يستدعي أخذ الحيطة والحذر الشديدين لأجل التحكم بهذا المرض.

- عضو هيئة تعليمية–قسم الصحة العامة والطب الوقائي– كلية الطب البيطري – جامعة البعث.

Detection of Q fever in Human by Polymerase Chain Reaction test (PCR)

V.M. MAHER ALHOURANI*

Abstract:

Q fever is a bacterial disease caused by Coxiella burnetii bacterium, This study was performed to investigate the existence of Q fever in human in the middle region of the Syrian Arab Republic, the study concentrated on tow regions which are Hamah city and Mysiaf , in addition to some places between them , using PCR test. Coxiella burnetii had been detected as a causative agent of Q fever with consideration that the samples were taken randomly. The prevalence rate reached at (68%) of the human groups included in the study. This result requires High degrees of caution in order to control this disease

*: MSC.Vet. Med. (D.V.M) in Veterinary Science , Buplic Health and preventive Medicine -Faculty of Veterinary Medicine , AL-Baath University.

١ – مقدمة Introduction :

شهدت العقود الأخيرة ازدياد أهميّة الأمراض الحيوانيّة المصدر أو الأمراض المشتركة (Zoonosis) والتي يشترك في المعاناة من ويلاتها الناس والحيوانات معاً، إلى جانب ازدياد وتعقيد وسائل المواصلات، وهو أمرُ أدى في مقابل ذلك إلى تسهيل وتسريع نشر العوامل الناقلة للأمراض، حيث لم يعد بمقدور أي فرد أو جماعة أن يكون بمأمن من الإصابة، ورغم قطع خطوات كبيرة على درب التقدّم العلمي والتكنولوجي في تشخيص وتصنيف هذه الأمراض، ورغم الإنجازات الكبيرة التي تحققت في مضمار المعالجة والوقاية فإنّ هذه الأمراض لاتزال تشكّل تهديداً خطيراً للصّحة العامة في العالم. جاءت هذه المقالة للكشف عن أحد الأمراض المشتركة التي لم يسبق أن تمت دراستها بشكل جدّي في القطر من قبل، والتي تؤثّر على الصحّة الإنجابيّة وعلى الصحّة العامّة عند الإنسان والحيوان وهذا المرض هو مرض الحمّى المجهولة (حمّى كيو).

الحمّى المجهولة أو حمى كيو (Q fever) هو مرض مشترك يتميز عند الإنسان بالعديد من الأعراض أكثرها شيوعاً الأعراض الشبيهة بالإنفلونزا مع درجات متفاوتة من التهاب الرئة والتهاب الكبد، بينما يبدو التهاب شغاف القلب (Endocarditis) العرض الرئيسي المميز للشكل المزمن للمرض (Parker et al.,2006). ترتكز أهميّة وخطورة الإصابة بالحمّى المجهولة عند المجترّات الصغيرة على حقيقة أنها من أكثر الحيوانات الحساسة للمرض، إضافة إلى كثرة اختلاط الإنسان مع هذه الحيوانات واستهلاكه لمنتجاتها (Blasco,1998)، وبحسب مركز الأمن الغذائي والصحّة العامة وهو معهد دولي للتعاون في مجال البيولوجيا الحيوانية فإن حمّى كيو هو مرض مشترك شديد العدوى (Highly contagious zoonotic disease) ينتج عن العامل الممرض داخل الخلوي والذي يدعى الكوكسيلّة البورنيتّة (Coxiella Burnetii) وعلى الرغم من أن هذه العدوى تمّ وصفها لأوّل مرّة في العام ١٩٣٠م إلّا أنها لا تزال مفهومة بشكل قليل (Center of food security & public health studies, 2007). وبحسب منظمّة الصحّة الحيوانيّة العالمية (OIE, 2012) فإن الحمّى المجهولة هي مرض منتشر في كل أنحاء العالم عدا نيوزيلندة، وعلى الرغم من أن المرض يوجد فعليّاً في كل المملكة الحيوانيّة 'animal kingdoms' بما فيها مفصليّات الأرجل فإنّه يظهر في الغالب على الإنسان والأبقار والأغنام والماعز (Lang, 1990; Maurin & Raoult, 1999; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005 and Anette-Bøtner et al., 2010).

يسبّب هذه المرض جراثيم الكوكسيلّة البورنيتيّة وهي جراثيم متطفلة مجبرة داخل الخلية الحية، سلبية الغرام، ويمكن تلوينها بصبغة جيمسا، يتراوح حجمها ما بين (0.2-0.4×0.4-1.0) ميكرون، وتعيش داخل الخلايا البلعمية للعائل المضيف، وتعتبر شديدة المقاومة للظروف البيئية الخارجية حين تواجدها خارج الخلية الحية (Dupuis.,1985). تنتمي هذه الجراثيم لجنس(Legionellales) وعائلة (Coxiellaceae) (Voth & Heinzen , 2007)، وتعد العامل المسبب لمرض حمى كيو أو ما يسمى بمرض الحمى المجهولة، حيث تم تشخيص هذا المرض لأول مرة عام ١٩٣٥م أثناء ظهور إصابات عند عمال مسلخ بريزوان في أستراليا (Hilbink., et al 1993).

تتوفر لدى مختبرات قليلة الإمكانات والمعدات اللازمة للاستخلاص المأمون للكوكسيلة البورتينية، ولذلك يفضل الاعتماد على الاختبارات المصلية. إن تشخيص الحمى المجهولة عند المجترات بما فيه التشخيص

التفريقي عن الأمراض المجهضة المماثلة تمّ بناءً على الاستفادة من الكشف بالميكروسكوب المتطوّر على عيّنات سريريّة بالترافق مع نتائج مسوحات مصليّة إيجابيّة (Lang, 1990)، وأمّا في الوقت الحالي فإن الكشف المباشر والقياس الذي يتم بواسطة اختبار(PCR) واختبار المقايسة المناعيّة الإنظيميّة ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ينبغي أن يعتبر طرقاً مختارة للتشخيص السريري (Sidi-Boumedine et al., 2010)، كما أن اختبارات المقايسة المناعية المرتبط بالإنظيم ELISA، وتثبيت المتتمة تعد من الاختبارات المستخدمة بشكل روتيني (Maurin& Raoult,1999). وقد استخدمت الطرق المختلفة لاختبار PCR بنجاح للكشف عن ال DNA الخاص بالكوكسيّلة البورنيتية في المزارع الخلوية والعيّنات البيولوجيّة، وعادة تستخدم هذه الطريقة للتقصّي الصحّي في قطعان المجترات حديثة الولادة والتي تحصل فيها حالات إجهاض (Sidi-Boumedine et al., 2010)، وتبدي الكوكسيلة البورنيتية مقاومة واضحة لمختلف العوامل الفيزيائية والكيميائية بسبب شكلها الشبيه بالبوغة، فهي تقاوم درجة الحرارة ٦٠ درجة مئوية لمدة ستين دقيقة وتقاوم التعرض لتركيز (٠,٥ %) من الفورمالين لمدة أربعة أيام، ويمكنها أن تبقى حية في التربة والحليب لعدة أشهر(Maurin&Raoult, 1999)، و أمّا في المزارع الخلوية أو أجنة البيض المخصب فإن الكوكسيلة البورنيتية تبدي تغيراً في المظهر مرتبطاً بحدوث شطب صبغي (Genetic blot) يقود إلى تبدل عديد سكريات شحمي ، و مع الطور الأول عالي الفوعة يتغير المظهر إلى الطور الثاني غيرالمفوع، و تبدي العزولات المأخوذة من مناطق مختلفة في العالم درجة منخفضة من التغايرية الجينية (Maurin&Raoult.,1999, Raoult., 2001).

بالنسبة لانتشار الحمّى المجهولة فهو واسع جدّاً بسبب ظاهرة الانتشار عبر حمل الرياح (Windborne spread) (Boschini A., et al 1999) ولكن بحسب خرائط منظمّة الصحّة الحيوانيّة العالمية للعام ٢٠١٣ فقد تبين أن المرض موجود في فلسطين المحتلّة وجزيرة قبرص وتم تشخيصه سريريّاً (OIE,2012)، وهناك أبحاث موثّقة عن كشف الحمّى المجهولة في منطقة مرمرة التركية، كما أنّ المرض موجود ومشخّص في بلغاريا واسبانيا واستراليا وأمريكا الشمالية وغيرها الكثير من بلدان العالم (OIE,2012)، ولكن لا يوجد حتّى اللحظة معلومات دقيقة عن انتشار المرض في سوريا عدا دراسة واحدة عند الأغنام (العمر، ٢٠١١).

٢- العلامات السريرية عند الإنسان Clinical Signs In Human:

يمكن أن يكون مرض الحمى المجهولة حاداً أو مزمناً ، والنتائج طويلة الأمد يتم التعود عليها كفصل ثالث للمرض، والعدوى اللاعرضية تعتبر شائعة ففي جائحة حصلت في أحد الوديان السويسرية تبين أن ٥٠% من الأشخاص اللّذين تم التأكّد من إصابتهم مصلياً أصبحوا مرضى بشكل واضح (Dupuis et al.,1987).

١- المرض الحاد Acute disease

يبدو الشكل الحاد لحمى كيو مشابهاً لأمراض الأنفلونزا مع درجات متفاوتة من التهاب الرئة و التهاب الكبد، وغالباً ما يحصل الخطأ في التشخيص نظراً لأن الأعراض متنوّعة وهي غير محددة بدقة (Fournier et al.,1998)and (McQuiston & Childs,2002)،(Raoult,1996).

الحمى ليست موجودة دائماً (Levy et al.,1999)،(Tissot-Dupont et al.,1992) كما أن إجراء التشخيص صعب، معدل الوفاة في هذه الحالة هو ١-٢% (Tissot-Dupont et al.,1992) (Kermode et al.,2003). يعد التهاب عضلة القلب نادراً (<١%)، لكنه واحد من أكثر الأسباب المؤدية للوفاة (Fournier et al.,2001).

كان قد اشتمل وصف الباحث ديريك الأصلي للمرض على الحمى وألم شديد بالرأس أغلبه يقع خلف العينين، وتعرق غزير وأوجاع عضلية ومفصلية بالإضافة لفقدان الشهية وخسارة حادة للوزن (Derrick,1937)، هذه السلسلة المتلاحقة تحصل في ٥-٢٠% من الحالات (De Alarcon et al.,2003)&(Tissot-Dupont et al.,1992)، وفي (١٣٨) حالة كانت الأجسام المضادة للمرض موجودة حيث دامت الحمى بين ٥-٥٧ يوم بمتوسط عشرة أيام (Derrick,1973)، وكانت معدلات الدخول للمشفى ٥% لكنها كانت عبارة عن حالات عرضية بنسبة ٦٣% (١٠ من أصل ١٦) (Carrieri et al.,2002). بالإضافة إلى عوارض شبيهة بالأنفلونزا يظهر التهاب الرئة الناتج عن حمى كيو بصورة سعال مخاطي غالباً مترافق مع ألم بالجنب والصدر(Marrie,2003)، وتكون التغيرات الظاهرة بالصورة الشعاعية للصدر غير محددة حيث يكون التهاب الرئة معتدل غالباً (Marrie,2003)، ويعد التهاب الكبد الصريح المترافق مع اليرقان نادراً (Maurin& Raoult,1999)، ولكن تضخم الكبد وارتفاع مقياس إنزيمات الكبد هي أمر شائع. دراسة أجريت على مجموعة من مرضى أحد المشافي في أستراليا تبين أنه فقط مريض واحد من أصل ١١١ مريضاً قد أصيب باليرقان، ولكن ٥١% من المرضى كان لديهم ضخامة بالكبد و ٨٥% من هؤلاء المختبرين كلن لديهم نتائج اختبارات وظائف كبد غير طبيعية (Carrieri et al.,2002)، ويتراوح دور الحضانة من أسبوعين إلى 39 يومًا بمتوسط 20 يوما للمرض، وخلافًا لأمراض الريكتسيات الأخرى لا تسبب حمى كيو طفحًا جلديًا. يتراوح المرض في الشدة لكن يكون حميدًا في معظم الحالات حيث تكون الكثير من حالات العدوى البشرية خفيفة وغير ظاهرة ولذلك تمر دون أن تكتشف، ونادرًا ماتهاجم حمّى كيو الأطفال تحت 10 سنوات, مع ذلك تم التبليغ عن ١٨ حالة عند أطفال تحت عمر ٣ سنوات خلال فترة 16 شهرًا في هولندا (Richardus et al., 1985) يكون المرض أكثر خطورة عند البالغين فوق 40 سنة ومعدل إماتة الحالات في حمى كيو الحادة أقل من 1%(Raoult et al., 2000).

٢- المرض المزمن chronic disease

يشكل التهاب شغاف القلب (٦٠-٧٠%) من أعراض مرض حمى كيو بالشكل المزمن (Raoult D &Marrie,1995)، وتبين أنه في مرسيليا بفرنسا فإن ١٥% من حالات التهاب شغاف القلب ناتجة عن الكوكسيلّة البورنيتيّة(Marrie & Raoult,1997) وتكون الحمى غائبة غالباً و النوابت الجرثومية (Vegetations) غائبة غالباً أو صغيرة (Marrie & Raoult,1997)،(Lepid et al., 2003).

هناك ما معدله ١٢ شهر بين بداية المرض وتشخيصه (Marrie & Raoult,1997). كل المرضى الّذين ظهرت لديهم نتائج زرع سلبية لإلتهاب شغاف القلب تم استثناؤهم من الإصابة بحمى كيو

(Fournier et al., 1998)، ويعد التهاب شغاف القلب قاتلاً مالم يتم استخدام المعالجة بالمضادات الحيوية (Rolain et al., 2003) حيث يتطور التهاب شغاف القلب عادة عند الأشخاص الواقعين تحت تأثير المرض، ففي دراسة من ١٠٢ مريضاً فرنسياً ٩٥ منهم كان لديهم اعتلالات صمامية موجودة مسبقاً وجد أنّ خمسة منهم كان لديهم مرض كابت للمناعة واثنان فقط لم يكن لديهما أي شيء مما سبق (Fenollar et al., 2001)، وعلى الرغم من أنّ مرض نقص المناعة المكتسب (الإيدز) غير مرتبط بالتهاب شغاف القلب لكنه مرتبط بحصول معدل أعلى للمرض الحاد عند الأفراد المعرضين للكوكسيلّة البورنيتية (Boschini et al., 1999)، ومن الممكن أن يحدث المرض المزمن بعد شهر (Fenollar et al., 2001) أو سنوات من المرض الحاد ومن الممكن ألا يكون هناك تاريخ لمرض حاد (Wilson et al., 1976).

- يصيب المرض الجهاز القلبي الوعائي بشكل رئيسي عندما يأخذ مساراً مزمنًا حيث يتراوح معدل الوفيّات للحالات في حمى كيو المزمنة من0%-65% ، في بريطانيا العظمى أصيب 92 (11%) من أصل 839 حالة من حمى كيو المثبتة بالتهاب الشغاف و 10 بمرض كبدي (Palmer and Young, 1982)، كما كان عند 259 مريضاً من 313 مصابًا بحمى كيو المزمنة التهاب الشغاف في دراسة في فرنسا ولدى معظمهم اعتلال صمامي سابق (Raoult et al., 2000). التهاب الشغاف هو المضاعفة الأكثر خطورة، وغالبًا مايكون قاتلاً عندما يحدث بين البالغين مع تواتر أكثر في الذكور من الإناث، و يتطور التهاب الشغاف ببطء ويظهر عادة بعد ١- ٢٠ سنة من المرض الحاد (Levy et al.,1999)، وقد لخّص الباحث ساويرز وزملاؤه (Sawyer et al., 1987) في العام (1987) مميزات 28 حالة من بلدان عديدة مختلفة حيث كان لدى 89 % من المرضى قصة لمرض صمامي، وكان الصمام الأبهري وحده هو الموقع في 46 % من الحالات ال 28، وكانت العلامات السريرية هي الحمى (86%) وضخامة الكبد (60%) وتضخم الطحال (68%) وبيلة دموية مجهرية (80%)، و قدّرت إحدى الدراسات أن خطورة تطور التهاب الشغاف هي 39% بين المصابين بحمى كيو مع عيوب صمامية (Fenollar et al., 2001).

٣- مواد وطرائق العمل : Materials and Methods

أولاً- مواد العمل: Materials

١- مجتمع الدراسة Study Population

تم البدء بالبحث من خلال القيام بعدة زيارات للمشفى الوطني بحماه ومصياف وللمجمّع الطبّي بحماه حيث تمّت مقابلة الأطبّاء المختصّين والمخبريين المسؤولين عن أخذ العيّنات، وتمّ أخذ الموافقة الرسميّة على أخذ العيّنات البشريّة المختلفة لأجل القيام بالكشف عن الكوكسيلّة البورنيتيّة فيها.

٢- جمع البيانات: Collecting Data

تم الحصول على المعلومات المتعلقة بالاستبيان من خلال جمع البيانات ذات الصلة بموضوع الدراسة من قبل الباحثين ، حيث تم تقسيم الاستبيان لعدة حقول أحدها تضمن **معلومات عن المريض** نفسه شملت الجنس والعمر إن وجد، وفيما إذا كان هناك إجهاض سابق أم لا عند النساء الحوامل، بينما الحقل الثاني شمل **العينات** من حيث نوعيّة العيّنة وتاريخ أخذ العينة والموقع، وأما الحقل الثالث فقد خصص **لنتيجة اختبار ال PCR**، وأما الحقل الأخير فهو **للملاحظات**، و قد شملت الدراسة 25 مريض ومريضة تم القيام بجمع البيانات المتعلقة بهم في الفترة الواقعة بين شهر شباط من العام ٢٠١٣م وحتّى نهاية نيسان من العام ٢٠١٣م. يبين الجدول رقم (١) صفيحة الاستبيان الوبائية التي تم تصميمها لجمع البيانات لمجتمع الدراسة خلال فترة الدراسة .

جدول رقم (١) ورقة استبيان للعيّنات المشمولة بالدراسة خلال الفترة الواقعة بين بداية شهر شباط من العام ٢٠١٣م وحتّى نهاية نيسان من العام ٢٠١٣م **في المنطقة الوسطى بسوريا**

رقم العيّنة	المريض			العيّنات			اختبار PCR	ملاحظات
	الجنس	العمر	وجود إجهاض	نوع العيّنة	الموقع	تاريخ أخذ العينة		
١								
٢								
٣								
٤								
٥								

٣- الأجهزة Instruments

تمّ استخدام الأجهزة التالية للقيام بالكشف عن الكوكسيلّة البورنيتية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) كما هو واضح في الجدول (٢):

الجدول (٢): الأجهزة المستخدمة للقيام بالكشف عن الكوكسيلّة البورنيتية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)

الأجهزة المستخدمة في اختبار تفاعل البُوليميِراز المتسلسل	
اسم الجهاز	اسم الشركة المنتجة
حجيرة معقمة	HERolaB الألمانية
مثفلة عالية السرعة	Spectrafuge 240 labnet الأمريكية
خلاط مغناطيسي	Advantec SR350 اليابانية
مدور حراري خاص باختبارتفاعل البوليميراز المتسلسل	TEchne TC-512الإنجليزية
جهاز رحلان كهربائي للكشف عن نواتج اختبار PCR	Biotechnology GMbh الأمريكية
جهاز قارئ الأشعة فوق البنفسجية موصول بكاميرا	UVIPRO Platinum+Mitsubishi P93Dالإنجليزية

ثانياً- طرائق العمل : Materials

١- جمع العينات Collection of the samples

قام الأطبّاء والمخبريّون بأخذ عيّنات على شكل مسحات مهبليّة من سيّدات تعرضن للإجهاض حاليّاً أو سابقاً ،كما تمّ القيام بأخذ عدّة مسحات بلعوميّة لأشخاص مصابين بالتهابات تنفسيّة معنّدة، وأخيراً تم أخذ عيّنات دم من قسم الأمراض الصدريّة والداخليّة بشكل عشوائي وتمّت معاملة هذه العيّنات لأجل استخلاص الكريّات البيضاء منها حيث سيتم لاحقاً اجراء اختبار (PCR) عليها.

١-المسحات المهبلية Vaginal Swabs

جمعت مسحات مهبلية بغسل الفتحة الخارجية للمهبل وتطهيرها بمحلول اليود المائي (0.2%) وأدخلت المسحات المعقمة ودوّرت بشكل دائري داخل المهبل ونقلت إلى المختبر في حافظة مبردة (Alton *et al.*, 1975).

٢-المسحات البلعوميّة pharynxal Swabs

يتم إدخال المسحات المعقمة الى منطقة البلعوم ومسحها عدّة مرّات بشكل دائري ، ومن ثم نقلها الى المخبر بحافظة مبّردة ليتم حفظها بالبرودة لحين الاستخلاص (Alton *et al.*, 1975) .

٣- عيّنات الدم Blood Samples

تمّ أخذ عيّنات الدم من المرضى من قبل المخبريين المختصّين من وريد الساعد بعد تعقيم المنطقة بمحلول اليود المائي (0.2%) أو بالكحول الطبّي ٧٠%، وتمّ وضع الدم في أنابيب تحتوي مضاد تخثّر

(EDTA)، ثمّ تم نقلها بحافظات الى المخبر بأسرع ما يمكن حيث تم بعدها العمل على استخلاص الكريّات البيضاء (نظراً لأن الكوكسيلّة البورنيتيّة تتوضع داخل الكريات البيضاء في جسم الثوي حيث تتكاثر ثم تفجّر الكريّة البيضاء لكي تهاجم خلايا أخرى) (Alton et al.,1988)، ويتم استخلاص الكريّات البيضاء عن طريق التثفيل وبالطريقة التالية حسب الشركة الموردة لكيت الاستخلاص (Qiagen Kit®):

١- يتم تثفيل عيّنة الدم الموضوعة في أنبوب يحتوي مضاد تخثّر (EDTA) بسرعة ٢٠٠٠g لمدّة عشر دقائق.

٢- تسحب الطبقة الفاصلة بين البلازما والكريّات الحمراء (طبقة بيضاء على سطح الخثرة الحمراء التي شكلتها الكريات الحمراء) بواسطة قسطرة خاصّة (ماصّة باستور) بكميّة حوالي ١مل من كل أنبوب، ويتم وضع هذه الكميّة في أنبوب زجاج نظيف يحتوي ١مل محلول PBS(ph=7) ونحرّك بالشفط.

٣- نسحب المزيج السابق ونضعه برفق في أنبوب سعة ٥مل زجاج حاوي على ٢مل من محلول الهيستوباك ١٠٧٧(Histopaque®- 1077 Sigma Diagnostics. Saint Quentin Fallavier, France) ولكن بدون أن نمزج المحتويات مع بعضها.

٤- يتم التثفيل بسرعة ٢٠٠٠g/٣٠دقيقة.

٥- يتم سحب طبقة الخلايا اللمفاوية الفاصلة بين المحلولين (طبقة لمّاعة بوضوح عند النظر اليها) بواسطة قسطرة خاصّة (ماصّة باستور) ويتم نقلها الى أنبوب سعة ٥مل جديد يحتوي ١مل PBS(ph=7) ونحرّك بالشفط.

٦- يتم اكمال محتوى الأنبوب الى ٤.٥مل بواسطة محلول PBS ويتم التحريك بلطف (غسيل أوّلي).

٧- يتم التثفيل بسرعة ٧٠٠g/٥ دقائق.

٨- يتم رمي الطافي ووضع ١مل محلول PBS فوق الراسب ومن ثمّ التحريك بالشفط ليتشكّل معلّق، بعدها يكمل الحجم الى ٤.٥مل بواسطة محلول PBS ويتم التحريك بلطف (غسيل ثاني).

٩- يتم التثفيل بسرعة ٧٠٠g/٥ دقائق.

١٠-يتم رمي الطافي وأخذ الراسب بإضافة ١مل PBS فوق الراسب ومن ثمّ التحريك بالشفط ليتشكّل معلّق، ثم ينقل الى أنبوب سعة ٢مل ونكمّل المحتوى الى ٢مل بواسطة محلول PBS (ph=7) (غسيل ثالث).

١١ - يتم التثفيل بسرعة ٧٠٠g/٥ دقائق، بعها يرمى الطافي ويسحب الراسب ليوضع في أنابيب أبندروف ويتم حفظه بالتجميد على درجة حرارة (-٢٠درجة مئويّة، أو - درجة مئويّة ٨٠).

٢-استخلاص الدنا Extraction of DNA

١- استخلاص الدنا من المسحات Extraction of DNA from Swabs

تم الاعتماد على بروتوكول الاستخلاص المتّبع من قبل شركة كياجن (Qiagen 2003) (QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook-2003)، حسب المراحل التالية:

٢-١-١-خطوات مهمّة قبل الاستخلاص:

- تبعاً للحجم المتزايد من محلول الدارئ AL الذي يستخدم عادةً لأجل هذا النوع من العمل يمكن أن يتم شراء وإعداد كميّة إضافيّة من هذا الدارئ بشكل منفصل.
- كل خطوات التثفيل تجري في درجة حرارة الغرفة (١٥-٢٥ درجة مئويّة).
- عند جمع العيّنة يجب مراعاة مسح أو حك الماسحة بثبات مقابل السطح الذي ينبغي أخذ العينة منه عدّة مرّات، وبعدها توضع الماسحة بالتجميد لحين بدء الاستخلاص.
- يجب تحضير محم مائي بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئويّة لكي يتم استخدامه في خطوات الاستخلاص.
- يجب معادلة الدارئ AE أو الماء المقطّر مع درجة حرارة الغرفةلأجل الفصل .
- ينبغي التأكّد من أن الدارئ AW1، والدارئ AW2 وبروتياز الكياجين قد تمّ تحضيرها حسب المعلومات الموجودة في دليل الاستخلاص. وفي حال تشكّلت رسابة في الدارئ يجب حلّها بالتحضين بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية.

٢-١-٢-خطوات الاستخلاص:

١- توضع الماسحة بعد اخراجها من التجميد في أنبوب تثفيل سعة ٢مل ونضيف ٤٠٠ميكرو ليتر من محلول PBS (PH=8.3) ويراعى اخراج محتويات الماسحة الى داخل الأنبوب عبر الضغط على ساق الماسحة باتجاه رأسها الموضوع داخل الأنبوب ، وبعدها يتم فصل رأس الماسحة بالنسبة لماسحات القطن أو الديكرون بفصلها بواسطة اليد أو بمقص .

٢- يضاف ٢٠ميكروليتر من محلول البروتياز (Qiagen Protease) أو من البروتياز K، و٤٠٠ميكرو ليتر من الدارئ AL للعيّنة. ويتم المزج حالاً بواسطة الرجّاج (Vortexing) لمدّة ١٥ ثانية.

٣- يتم التحضين بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئويّة لمدّة عشر دقائق ، وبعدها نثفّل بسرعة عادية لفترة قصيرة لإزالة القطيرات من السطح الداخلي للغطاء.

٤- يضاف ٤٠٠ ميكروليتر من الايتانول المطلق (٩٦-١٠٠%)، ويجري المزج بالرج (Vortexing)، وبعدها نثفّل بسرعة عادية لفترة قصيرة لإزالة القطيرات من السطح الداخلي للغطاء.

٥- يتم نقل ٧٠٠ميكروليتر من المزيج في الخطوة رقم (٤)، الى عمود الفصل (Spin Column)(سعة ٢مل) من دون ترطيب الغطاء، يغلق القلنسوة ويجري التثفيل على سرعة ٦٠٠٠g (٨٠٠٠د/دقيقة) لمدّة دقيقة واحدة، بعدها يتم وضع عمود الدوران في أنبوب جمع سعة ٢مل نظيف ورمي الأنبوب الحاوي على الرشاحة.

٦- تعاد الخطوة السابقة رقم ٥ كما هي.

٧- يتم فتح عمود الدوران بعناية ويضاف ٥٠٠ميكوليتر من الدارئ AW1 من دون ترطيب الغطاء، بعدها يتم إغلاق القلنسوة والتثفيل على سرعة ٦٠٠٠g (٨٠٠٠د/دقيقة) لمدّة دقيقة واحدة. بعد التثفيل يوضع عمود الدوران في أنبوب جمع نظيف سعة ٢مل ويتم التخلّص من الأنبوب الحاوي على الرشاحة.

٨- يتم فتح عمود الدوران بعناية ويضاف ٥٠٠ميكوليتر من الدارئ AW1 من دون ترطيب الغطاء، بعدها يتم إغلاق القلنسوة والتثفيل على سرعة قصوى ١٤٠٠٠g (٢٠٠٠٠دورة/دقيقة) لمدّة ٣ دقائق.

٩- يتم وضع عمود الدوران في أنبوب تثفيل صغري سعة ١.٥ مل ، ويتم التخلّص من أنبوب الجمع الحاوي على الرشاحة، يضاف لأنبوب التثفيل الصغري ١٥٠ميكرو ليتر من الدارئ AE، أو الماء المقطّربعدها يجري التحضين بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ دقيقة ، يجري بعدها التثفيل عند ٦٠٠٠g (٨٠٠٠د/دقيقة) لمدّة دقيقة واحدة، وتحفظ المادّة بعد التثفيل الأخير برقم العيّنة الأساسي في البرّاد بدرجة حرارة (-٢٠ د مئويّة) لحين الاستخدام.

٢- استخلاص الدنا من الكريّات البيضاءExtraction of DNA from white cells

١- يوضع ٢٠ميكروليتر من البروتياز ك (Protease k) في أنبوب اختبار نظيف سعة ٢مل.

٢- يضاف للأنبوب أعلاه ٢٠٠ميكروليتر من عيّنة الكريات البيضاء التي تم استخلاصها بطريقة الهيستوباك (إذا كانت الكميّة أقل من ٢٠٠ تكمّل لهذا الحجم بمحلول الدارئة الملحيّة PBS).

٣- يضاف ٢٠٠ ميكروليتر من محلول دارئ AL الى المزيج ، ثم نرج الأنبوب بجهاز الفورتكس (Vortexing) لمدّة ١٥ ثانية.

٤- تحضين عند درجة حرارة ٥٦د مئويّة لمدّة ١٠ دقائق بمحم مائي.

٥- تثفيل بطيئ لإنزال القطرات العالقة على الغطاء الداخلي للأنبوب.

٦- يضاف ٢٠٠ ميكروليتر من كحول الايثانول المطلق للمزيج ثم يتم الرج بالفورتكس ، ومن ثمّ تثفيل بطيئ لإنزال القطرات العالقة على الغطاء الداخلي للأنبوب.

٧- يتم بعدها نقل المحتويات الى عمود الفصل (Spin Column) (سعة ٢مل) من دون ترطيب الغطاء، يغلق القلنسوة ويجري التثفيل على سرعة ٦٠٠٠g (٨٠٠٠د/دقيقة) لمدّة دقيقة واحدة (ينصح البعض هنا بأن يتم التثفيل بالسرعة القصوى حتّى تمام عمليّة التصفية بالفلتر الخاص بعمود الفصل).

٨- يتم التخلّص من الرشاحة ويوضع عمود الفصل على أنبوب تجميع جديد ويضاف بعد فتح الغطاء ٥٠٠ميكروليتر من الدارئ AW1 وبعدها يتم التثفيل على سرعة ٦٠٠٠g (٨٠٠٠د/دقيقة) لمدّة دقيقة واحدة.

٩- يتم التخلّص من الرشاحة ويوضع عمود الفصل على أنبوب تجميع جديد ويضاف بعد فتح الغطاء ٥٠٠ميكروليتر من الدارئ AW2 وبعدها يتم التثفيل على سرعة كاملة لمدّة ٣دقائق للتأكّد من تمام التصفية بالفلتر.

١٠-تنقل محتويات العمود الى أنبوب أبندروف معقّم يضاف له ٢٠٠ميكروليتر من الدارئة AE ثم يتم التحضين بدرجة حرارة الغرفة لمدّة ٥ دقائق، ويتم بعدها إجراء تثفيل أخير يليه حفظ عيّنة الDNA في البرّاد عند درجة حرارة (-٢٠ د مئويّة).

٣-الاختبار الرسمي للكشف عن الكوكسيلّة البورنيتيّة:

ConventionalPCR fordetecting of Coxiellaburnetii: (AccuPrime ® Taq DNA Polymerase)

١- عام General:

يتم تحديد الدنا الخاص بالكوكسيلّة البورنيتيّة من خلال مضاعفة الشدفة ذات الوزن (337pb) الموجودة في المورثة (IS1111) بين النيكليوتيد (349) والنيكليوتيد (685) وذلك باستخدام المشرّعات (البرايمرات) من النوع (Trans B and Trans M)، وذلك بحسب توصية المختبر الوطني الفرنسي للأبحاث الزراعيّة (laboratory INRA) (Institut National de la Recherche Agronomique) بالقسم المختص بالصحّة العامة والأمراض الحيوانيّة المعدية. يقدّم هذا النظام حساسيّة عالية للكشف عن السلالات الحقليّة الخاصّة بالكوكسيلّة البورنيتيّة ، ولقد بنيت هذه الحساسيّة العالية على وجود نسخ متعدّدة من المورثة (IS1111) في DNA الكوكسيلّة البورنيتيّة من جهة ، ومن ناحية أخرى على وجود مشرّعات أكثر فاعليّة من النوع (Trans B and Trans M) (Rodolakis A. Cochonneau D., unpublished data).

٢- المواد المستخدمة في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل Polymerase chain reaction Materials

١- المشرعات Primers : استخدمت مشرعات خاصة بجراثيم الكوكسيلّة البورنيتيّة والمنتجة في شركة Funakoski اليابانية، سوائل المشرّع ذو التسلسل ('5- 3) بتركيز ١٠٠ ميكرو مول ، ومحفوظة بدرجة حرارة (- ٢٠درجة مئويّة) (MWG - Eurofin). تحضير المحاليل الجاهزة : ٢٠ ميكرومول في ماء معقّم خال من انظيم ال RNase (distilled RNase-free water) بقسمة (١/٥ أجزاء)، وفيما يلي التسلسل النيكليوتيدي للمشرع من النمط B ومن النمط M:

- **Trans B (349-371): CAA GAA TGA TAA CGA TCG TGC GC**
- **Trans M (664-685): CTC GTA ATC AAT ACC TTC CGC G**

المصدر (Alsaleh A et al .,2011)

٢- عتيدة اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل: Taq PCR Master mix 4x

- والتي تحوي أنزيم البُوليميراز **(0,25 µl)** Taq DNA Polymerase (هو إنزيم يعود إلى مجموعة بوليميراز الدنا يستخرج من بكتريا المستحرة المائية (bacteriumthermophilic) التي تعيش في درجات حرارة عالية مقارنة بأغلب البكتريا ويستخدم على نطاق واسع في التقنية الحيوية وهو إنزيم أساسي في تفاعل البوليميراز المتسلسل) (Alsaleh et al.,2011)، دارئة تفاعل البُوليميراز المتسلسل مع كلور المَغْنيزيُوم (PCR Buffer with 3mM MgCl2)، والنيوكليوزيدات منقوصة الأوكسجين

ثلاثية الفوسفات (٢٠٠µM dNTP) (deoxynucleotide triphosphates)، وهو مركّز ١٠ مرّات من شركة Qiagen الألمانية.

٣- ماء مقطر خالي من DNAase:

ماء معقّم خال من انظيم ال RNase (distilled RNase-free water)، استخدم في استخلاص قالب الدنا وفي تحضير مزيج التفاعل وقد تم الحصول عليه من شركة Qiagen الألمانية.

٤- معلم الوزن الجزيئي (100bp DNA Molecular weight marker)

تم الحصول عليه من شركة (AB-gene) الإنجليزية والذي استخدم من أجل معرفة الوزن الجزيئي لنواتج التفاعل

٥- الأغاروز Agarose

تم الحصول عليه من شركة (Peq lab) الألمانية واستخدم بتركيز ١.٥% لغرض تحضير هلامة الأغاروز المستخدمة في الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل.

٦- دارئة التحميل 10 x Loading Buffer

تم الحصول عليها من شركة TaKaRa اليابانية واستخدمت في حقن نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل عند إجراء الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز.

٧- صبغة الإيثيديوم بروميد Ethidium Bromide

استخدمت الصبغة المصنعة في شركة ميرك الألمانية والتي تتميز بأن لها القدرة على الارتباط بأنطقة الدنا الموجود في هلامة الأغاروز والتألق عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية، وقد أضيفت إلى هلامة الأغاروز وإلى دارئة الرحلان بتركيز ١مكروغرام/مل.

٣- اختبار PCR :

١- تجهيز مزيج الاختبار Preparation of the PCR Mix

يجري البدء بتحضير مزيج PCR في غرفة المزج حيث يتم المزج على حمالة أنابيب خاصّة وفي درجة حرارة منخفضة (قد تحتوي الحمالة على جليد). بعد الإذابة يتم مزج مواد التفاعل من خلال التدفّق الهادئ عبر الماصّة الدقيقة micropipette لبعض المواد مثل المشرّعات أو ال إنظيم (Taq polymeras)، أو يتم

رج الدارئ. يتم بعدها القيام بدوران سريع لتجميع كل القطرات المتكاثفة في الانبوب وبعدها تترك المواد في الجليد. ويلاحظ ما سبق في الجدول التالي (٣):

الجدول (٣): المواد الداخلة في اختبار *PCR* مع الأحجام المستخدمة.

Components	Volume / reaction	Final concentration
H_2O RNase free	**17,75 µl**	
Tampon 10 x	**2,5 µl**	1x
TRANS B (20 µM)	**0,75 µl**	0,6 µM
TRANS M (20 µM)	**0,75 µl**	0,6 µM
Taq Polymérase	**0,25 µl**	1,25 U
Total mix	**22 µl**	

- يتم سحب ٢٢ ميكرومول من المزيج بماصّة ووضعها في أنبوب صغير سعة (٠.٢ مل)، وتحفظ هذه الأنابيب بالجليد لحين إضافة العيّنات.

٢- بدء الاختبار *PCR*:

يتم وضع كمية ٣ ميكرو مول من عيّنة الدنا المأخوذة لأجل الاختبار في الأنابيب السابقة سعة (٠.٢ مل) الحاوية على مزيج التفاعل ، بعدها يتم وضع الأنابيب في جهاز المدور الحراري (thermocycler) (Mastercycler ®, Eppendorf) والذي يتم برمجته وفق النظام التالي في الجدول (٤) :

الجدول (٤) : النظام الحراري المستخدم في جهاز المدور الحراري

Activity	Temperature (° C)	Time (min)	Number of cycles
Initial denaturation	**94**	**10**	**1**
Denaturation	**94**	**30 sec**	**35**
Hybridization	**63**	**1**	**35**
Elongation	**72**	**3**	**35**
Final elongation	**72**	**10**	**1**

وبحسب النظام الحراري أعلاه يتم تضخيم شدفات محدّدة من الدنا الخاص بجرثوم الكوكسيلّة البورنيتيّة ملايين المرّات ليظهر في المرحلة التالية.

٣- تحليل النواتج بواسطة الفصل الكهربائي لهلام الأغاروز:

Analysis of amplified products by agarose gel electrophoresis:

يتم تحضير هلام الأغاروز بتركيز ١.٥% بإضافة :

- من أجل الكميّة الصغيرة من الهلام يتم إضافة ٦٠ مل من محلول (1X TAE or TBE 1X) يتم إضافة ٠.٩ غرام من بودرة الأغاروز.
- من أجل الكميّة الكبيرة من الهلام يتم إضافة ١٠٠ مل من محلول (1X TAE or TBE 1X) يتم إضافة ١.٥ غرام من بودرة الأغاروز.
- يتم إذابة الأغاروز في المحلول بوضع الدورق في الميكروويف ، ويراعى تبريد المزيج بعدها الى الدرجة ٦٠ درجة مئوية قبل الصّب.
- يتم الصب في الجهاز الخاص بالصب ويشترط أن تكون الوضعيّة أفقيّة ، ويترك الهلام ليتصلّب حتى يصبح لونه كامد (يفقد شفافيّته).
- يتم صب الدارئ TAE or TBE على الهلام المتصلّب.
- إن المواد الخاصّة باختبار PCR تم تجهيزها لكي يتم تصنيفها من خلال الرحلان الكهربائي Electrophoresis على جهاز Parafilm ، يتم خلط ١٥ ميكرو مول من كل عيّنة مع ٥ميكرومول من محلول دارئ التحميل (Loading buffer)، وتوضع في داخل الحفر المناسبة داخل الهلام.
- بشكل مواز يتم إضافة مايعرف بمعلّم الوزن الجزيئي (Molecular Weight Marker) من نوع Smartladder (Eurogentec, Belgium) ، ويمتلك هذا المعلّم ١٤ شريط يتراوح مابين ٢٠٠-١٠٠ بيس بير .
- يتم وصل التيار الكهربائي بعد وضع صينيّة الهلام في جهاز الترحيل.
- يتم الرحلان لمدّة ١٥ دقيقة على كمون ٢٠ فولط، ثم لمدة ساعة وربع على كمون ٨٠ فولط، ويستمر الرحلان حتّى تصل سوائل رواسب الصبغة المستخدمة الى ٨٠% من هلام الأغاروز المستخدم.
- يتم وضع الهلام في محلول **BET** (١ميكروغرام / مل) ٢٥ ميكروليتر من المحلول(stock solution) في ٢٥٠مل من الماء المقطّر مرتين لمدّة عشر دقائق حتّى ساعة واحدة كحد أقصى.
- يتم رؤية الأشرطة بواسطة جهاز الأشعّة فوق البنفسجيّة (ultra violet (UV) light).

٤- قراءة وتحليل اختبار ال PCR: ***Reading and interpretation of PCR***

لكي يتم تقييم الاختبار من المهم ملاحظة أن عيّنة التحكم الإيجابيّة هي عيّنة اختبار PCR مضخّمة ذات وزن ٣٣٧ بيس بير (337 bp)، وبناءً عليه فأي عيّنة تمتلك شريط على نفس المستوى تعتبر إيجابيّة ، بينما الآثار المتوافقة مع عيّنات تحكّم سلبيّة بدون DNA يجب أن لا تحتوي أي شريط.

ثانياً– النتائج والمناقشة:Discussion & Results

كانت النتائج تحتوي على إيجابية عالية فمن أصل (٢٥) عينة مدروسة كانت هناك (١٧) عينة إيجابية بنسبة إصابة قدرها (٦٨%) ، و(٨) عيّنات سلبيّة بنسبة قدرها (٣٢%)، مع العلم أنه تم أخذ هذه العينات من مناطق متعددة في منطقة حماه وريفها ومع العلم أيضاً أن البعض من المسحات المهبليّة التي شملتها الدراسة كانت قد أخذت من سيّدات تعرضن مسبقاً لأكثر من إجهاض، وتبيّن الصورة التالية (٢٧) مثالاً عن عيّنات تمّ أخذها والكشف عنها باختبار ال PCR:

الصورة (٢٧): نتيجة اختبار الكشف عن جرثوم الكوكسيلّة البورنيتيّة باختبار PCR حيث تكون العيّنة الإيجابيّة هي عيّنة اختبار PCR مضخّمة ذات وزن (337 bp) حسب ما يشير اليه السهم ➡ (الباحث).

وعلى اعتبار أن نسبة الإصابة بالحمى المجهولة في هذه الدراسة كانت (٦٨%) فقد تم حساب الخطأ المعياري في هذه النسبة وفقاً للقانون التالي رقم (٣) :

$$SE(P) = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

حيث أن القيمة (p=0.68) تعبر عن نسبة انتشار الحمى المجهولة في المجموعة البشرية المدروسة، وبالنتيجة فقد كانت قيمة الخطأ المعياري ($SE(P)= 0,07$)، وتم حساب دقة النتائج من خلال حساب ما يدعى بحد الثقة للنسبة المئوية **The Confidence Interval for a Proportion** حيث أن حد الثقة لنسبة حيوانات الدراسة يحسب من خلال إضافة وطرح النسبة المئوية للعينة (p) مضروباً بالخطأ المعياري وهكذا فإن حد الثقة 95% لنسبة حيوانات الدراسة يمكن أن يقدر من خلال القانون التالي رقم (٢) :

$$P \mp 1.96 \times SE(P) =$$
$$\left\{ P - 1.96\sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}, P + 1.96\sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} \right\}$$

تم حساب قيمة الخطأ المعياري ($SE(P)= 0,07$) وبناءً على القانون السابق وعلى اعتبار أن قيمة p = 0.68 فقد تم حساب حد الثقة وكان كما يلي:

(حد الثقة 95% الأعلى =0.77، حد الثقة 95% الأدنى =0.47)

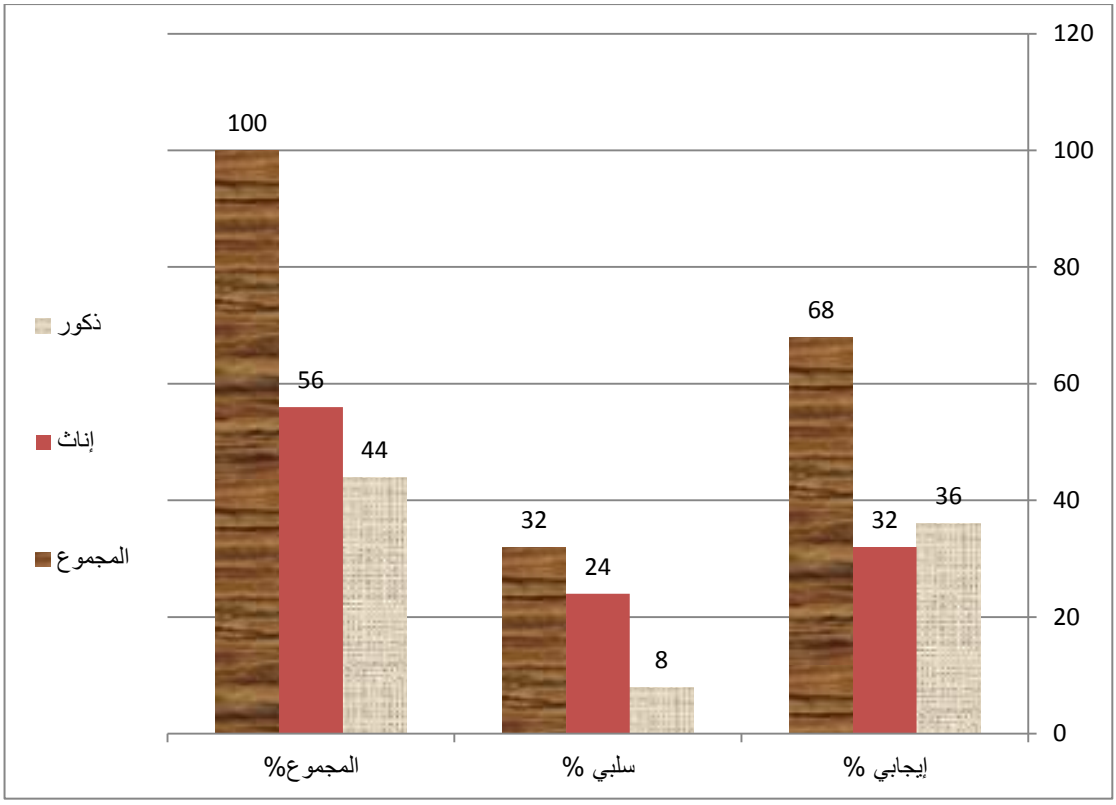
ثم دققت النتائج من خلال استخدام نظم Access، وتم تصدير هذه البيانات لإجراء التحاليل الإحصائية و الوبائية في نظام Statistics (Analytical Software@1998) **النسخة ٢.٠.**

تم التوصّل الى نتائج اختبار PCR للعيّنات البشريّة التي تم أخذها، وبحساب بسيط لنسبة توزّع الإصابة بين الجنسين الذكور والإناث بحسب عشوائيّة أخذ العيّنات فقد تم الحصول على النتائج الموضّحة في الجدول التالي (٥):

الجدول (٥): التكرار المطلق والنسبة المئوية للإصابة بالحمى المجهولة عند مجتمع الدراسة

	إيجابي	إيجابي %	سلبي	سلبي %	المجموع	المجموع %
ذكور	٩	%٣٦	٢	%٨	١١	%٤٤
إناث	٨	%٣٢	٦	%٢٤	١٤	%٥٦
المجموع	١٧	%٦٨	٨	%٣٢	٢٥	%١٠٠

ويبيّن المخطط التالي (١) البيانات السابقة التي توضّح نسبة توزّع الاصابة بالحمّى المجهولة بين الاناث والذكور:



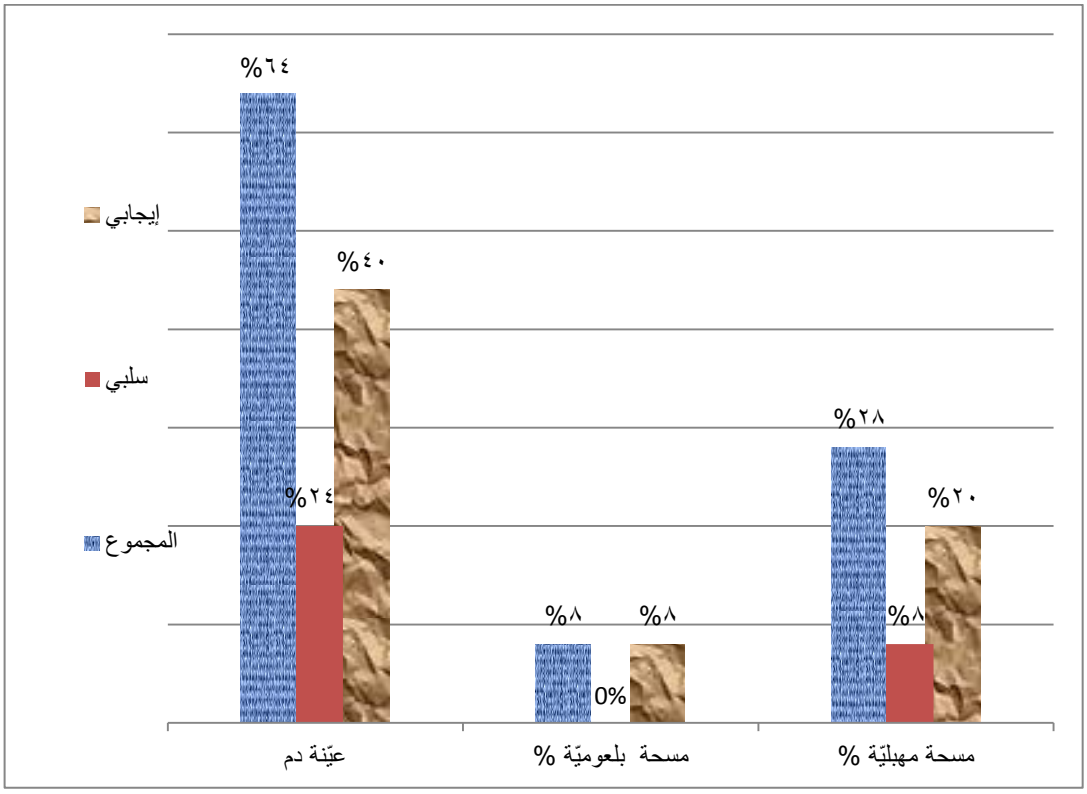
المخطط(١): نسبة توزّع الاصابة بالحمّى المجهولة بين الاناث والذكور

وبالنسبة لتوزّع النتائج بحسب نوع العيّنات فقد تم الحصول على النتائج الموضّحة في الجدول التالي (٦):

الجدول (٦): التكرار المطلق والنسبة المئوية للإصابة بالحمى المجهولة بحسب نوع العيّنات عند مجتمع الدراسة.

	مسحة مهبليّة	مسحة مهبليّة %	مسحة بلعوميّة	مسحة بلعوميّة %	عيّنة دم	عيّنة دم %	المجموع	المجموع (%)
إيجابي	٥	%٢٠	٢	%٨	١٠	%٤٠	١٨	%٦٨
سلبي	٢	%٨	٠	%٠	٦	%٢٤	٧	%٣٢
المجموع	٧	%٢٨	٢	%٨	١٦	%٦٤	٢٥	%١٠٠

ويبيّن المخطّط التالي (٢) البيانات بالنسب المئويّة لنسبة الاصابة بالحمّى المجهولة حسب نوع العيّنة المأخوذة:



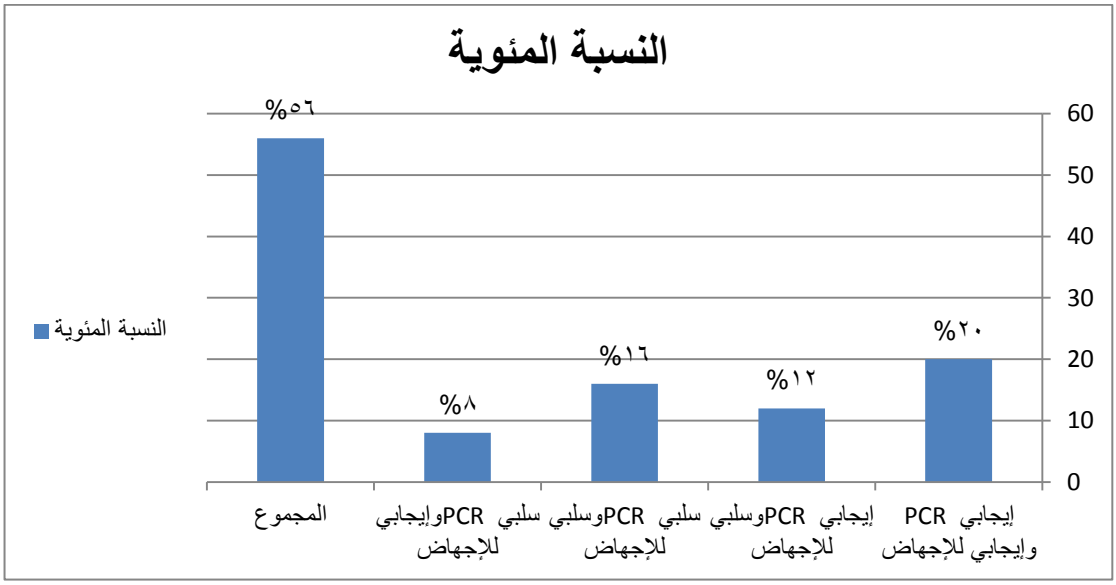
المخطّط (٢): البيانات بالنسب المئويّة لنسبة الاصابة بالحمّى المجهولة حسب نوع العيّنة المأخوذة

وبالنسبة للعلاقة بين الاجهاض والحمّى المجهولة فقد تم التوصّل للجدول التالي (٧) الذي يبيّن عدد ونسبة الحالات الإيجابيّة والسلبيّة للإجهاض ولإختبار PCR:

الجدول (٧) الذي يبيّن عدد ونسبة الحالات الإيجابيّة والسلبيّة للإجهاض ولإختبار PCR

	إيجابي PCR وإيجابي للإجهاض	إيجابي PCR وسلبي للإجهاض	سلبي PCR وسلبي للإجهاض	سلبي PCR وإيجابي للإجهاض	المجموع
عدد العينات	٥	٣	٤	٢	١٤
النسبة المئوية	٢٠	١٢	١٦	٨	٥٦

ويبيّن المخطّط (٣) العلاقة بين الإجهاض والحمّى المجهولة كما يلي:



المخطّط (٣): العلاقة بين الاجهاض والحمّى المجهولة

حيث يبدو بوضوح وجود علاقة بين الإجهاض والاصابة بالحمّى المجهولة (٢٠%) ويؤكّد على صحّة هذه العلاقة ارتفاع المقياس المعبّر عن العيّنات سلبيّة الإجهاض والسلبيّة لإختبار PCR (١٦%).

بحسب هذه الدراسة التي تعد الأولى من نوعها في الجمهوريّة العربيّة السوريّة على مستوى الكشف عن مرض مشترك كالحمّى المجهولة عند البشر فقد تمّ الكشف عن العامل المسبّب للمرض وهو الكوكسيلّة البورنيتيّة في العيّنات المتنوعة التي أتيح أخذها للباحثين وذلك بالاعتماد على اختبار تفاعل سلسلة البوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction) والذي يعتبر أحد أهم الاختبارات المعتمدة للكشف عن مرض الحمّى المجهولة بحسب منظمة الصحّة الحيوانيّة العالميّة (OIE *Terrestrial Manual* 2010) وبناءً على ماسبق فقد تبيّن أنّ نسبة الاصابة بالحمّى المجهولة في العيّنات التي بلغ عددها ٢٥ عيّنة كانت مرتفعة للغاية حيث بلغت (٦٨%) وهذه النسبة متقاربة بشكل كبير مع دراسة وبائيّة مصليّة أجريت في هولندا بين الأعوام ١٩٦٨-١٩٨٣ وذلك للكشف عن الحمّى المجهولة حيث تم التوصّل إلى وجود انتشارات مصليّة في مجموعات عالية الخطورة عبارة عن الأطباء البيطريين الحقليين ومحنطي الحيوانات Taxidermists والنساء العاملات في صناعة الأصواف حيث تبيّن بنتيجة هذه الدراسة أن نسبة الانتشار المصلي للحمّى المجهولة قد بلغت ٧٦% (Richardus et al., 1985; Houwers and Richardus, 1987; Richardus et al., 1987) ، وفي دراسة مصليّة في إقليم النيل الأعلى جنوب السودان كان الانتشار المصلي مخالفاً لنتائج دراستنا في التجمعات البشرية بنسبة 39% (Reinthaler et al., 1988)، وقد كانت نسبة الإصابة عند الذكور أعلى من الإناث في الدراسة ١.١٢/١ (٣٢%،٣٦%) ،وهذا يتوافق مع دراسة تمّت في هولندا تفوّق الرجال على النساء فيها بنسبة الإصابة حيث كانت نسبة لإصابة النساء بالنسبة للرجال ١.٧/١ (Schimmer et al., 2008). بينما لوحظ وجود علاقة بين وجود إجهاض ووجود نتيجة إيجابيّة لاختبار PCR حيث تم استخدام معامل الارتباط بيرسون CORRELATIONS (PEARSON) للكشف عن العلاقة وتبيّن أنها معنويّة قويّة (P-VALUE = 0.0249) وللتوضيح فقد شمل هذا الاستقصاء ثماني سيّدات أخذت

منهن مسحات مهبليّة للكشف عن الحمّى المجهولة وتمّ حساب القيمة P-VALUE بالاعتماد على برنامج Statistics، وفي هذه الدراسة كانت نسبة السيدات اللاتي أثبت اختبار pcr وجود الكوكسيلة البورنيتية لديهن عالية للغاية حيث بلغت (٦٤.٢٨%) (٩ من أصل ١٤ سيدّة) بينما كانت النسبة أقل من ذلك بكثير في دراسة تمّت في مدينة لندن في العام ٢٠٠٩ من قبل الباحثين (Baud ., et al 2009) حيث التماس مع المجتمع الحيواني بأقل مايمكن وقد وجد هؤلاء أن نسبة (4,6%) من النساء المشمولات بالدراسة إيجابيات مصلياً لإختبار التألق المناعي غير المباشر (Indirect Immunofluorescence) وذلك للكشف عن أضدادالكوكسيلة البورنيتية عندهن، ويمكن تفسير هذه الاختلاف الكبير بعاملين الأوّل هو الاختلاف في الاختبار الذي تم الاعتماد عليه للكشف عن الحمّى المجهولة، والأمر الآخر هو الاختلاف في طريقة أخذ العيّنات بين الحالتين ففي لندن كانت الطريقة عشوائيّة غالباً من نساء حوامل لاعلى التعين، وفي هذه الدراسة كانت العيّنات شبه مستهدفة .

٤- ثالثاً- الإستنتاجات والتوصيات:

١- مرض الحمى المجهولة الذي تسببه جراثيم الكوكسيلة البورنيتية هو مرض موجود عند البشر في المنطقة الوسطى من القطر العربي السوري.

٢- نسبة انتشار المرض مرتفعة بشكل كبير وواضح.

٣- لوحظ وجود علاقة بين وجود إجهاض ووجود نتيجة إيجابيّة لاختبار PCR وقد تبيّن أنها معنويّة قويّة (P-VALUE = 0.0249).

٤- إن نسبة انتشار المرض المرتفعة تجعلنا ندق ناقوس الخطر عند الجهات المهتمة بانتشار الأمراض الوبائية، وبخاصة أن مرض الحمى المجهولة هو مرض مشترك يصيب الإنسان والحيوان، ويسبب اضطرابات صحية تبدأ بالتوعك الصحي غير الملحوظ وتنتهي بالوفاة في بعض الحالات.

ثالثاً– المراجع:

١– المراجع العربيّة:

١– العمر أنور . التقصي المصلي عن وجود الكوكسيلا بورنيتي عند الأغنام في المنطقة الوسطى. بحث منشور في مجلّة جامعة البعث ، ٢٠١١.

٢– المراجع الأجنبيّة:

1- Alsaleh A, Pellerin J-L, Rodolakis A, Larrat M, Cochonneau D, Bruyas J-F, Fieni F.(2011) .Detection of Coxiella burnetii, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis, 34:355-360.
2- Alton, G. G; Jones, L. M. and Pietz, D. E. (1975). Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. World Health Organization. Geneva.
3- Alton, G.G; Jones, L.M; Angurs, R.D. and Verger, J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA. Paris, France.
4- Arricau-Bouvery N. & Rodolakis A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res., 3, 327–349.
5- Baud, O. Peter, C. Langel, L. Regan, and G. Greub. (2009). Seroprevalence of Coxiella burnetii and Brucella abortus among pregnant women Journal Compilation (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 15, 496–501.
6- Blasco, J.M. (1998). A review of the use of Coxiella burnetii Vaccine in adult sheep and goats. Prev. Vet. Med. 34:160-183.
7- Boschini A, Di Perri G, Legnani D.(1999). Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis; 28: 866–72.
8- Carrieri MP, Tissot-Dupont H, Rey D.(2002). Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 21: 17–21.
9- Center of food security & public health studies, (2007). College of Veterinary Medicine lows state university Ames, lows 50011.1
10- De Alarcon A,Villanueva JL, Viciana P.(2003). Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. J Infect; 47: 110–16.
11- Derrick E. Q fever,(1937).A new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med J Aust; 2: 281–99.
12- Derrick E.(1973) The course of infection with Coxiella burnetii. Med J Aust; 1: 1051–57.
13- Dupuis G, Peter O, Pedroni D, Petite J.(1985) Clinical aspects observed during an epidemic of 415 cases of Q fever. Schweiz Med Wochenschr;115:814–8.
14- Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M.(1987) An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. Int J Epidemiol; 16:282–87.

15- Anette-Bøtner, Donald Broom, Marcus G. Doherr, Mariano Domingo, Jörg Hartung, Linda Keeling, Frank Koenen, Simon More, David Morton, Pascal Oltenacu, Albert Osterhaus, Fulvio Salati, Mo Salman, Moez Sanaa, James M. Sharp, Jan A. Stegeman, Endre Szücs, Hans-H. Thulke, Philippe Vannier, John Webster and Martin Wierup; (2010). EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever. EFSA Journal, 8 (5), 1595, 114 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595.
16- Fenollar F, Fournier P, Carrieri MP, Habib G, Messana T,RaoultD.(2001) Risk factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis; 33: 312–16.
17- Fournier P, Marrie TJ, Raoult D.(1998). Diagnosis of Q Fever. J Clin Microbiol; 36: 1823–34.
18- Fournier PE, Etienne J, Harle JR, Habib G, Raoult D. Myocarditis,(2001). A rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature. Clin Infect Dis; 32: 1440–47.
19- Hilbink F, Penrose M, Kovacova E, Kazar J.(1993). Q fever is absent from New Zealand. Int J Epidemiol; 22: 945–49.
20- Houwers, D.J., Richardus, J.H., (1987). Infection with Coxiella burnetii in man and animals in the Netherlands. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 267, 30–36.
21- Kermode M, Yong K, Hurley S, Marmion B. (2003). An economic evaluation of increased uptake in Q fever vaccination among meat and agricultural industry workers following implementation of the National Q Fever Management Program. Aust N Z J Public Health; 27: 390–98.
22- LANG G.H. (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. *In:* Q Fever. Volume I: The Disease, Marrie T.J., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 23–48.
23- Lepidi H, Houpikian P, Liang Z, Raoult D.(2003). Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, histologic studies. J Infect Dis; 187: 1097–106.
24- Levy PY, Carrieri P, Raoult D.(1999). Coxiella burnetii pericarditis: Report of 15 cases and review. Clin Infect Dis; 29: 393–97.
25- Marrie T J.(2003). Coxiella burnetii pneumonia. Eur Respir J; 21(4):713–9.
26- Marrie TJ, Raoult D.(1997). Q fever—a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents; 8: 145–61.
27- MAURIN M. & RAOULT D. (1999). Q fever. *Clin. Microbiol. Rev*., 12, 518–553.
28- McQuiston JH, Childs JE.(2002). Q fever in humans and animals in the United States. Vector Borne Zoonotic Dis; 2: 179–91.
29- Neil R Parker, Jennifer H Barralet, Alan Morton Bell,(2006). Q fever, Seminar Vol 367 February 25, 2006.
30- OIE Technical disease card, (2012) :www.oie.int/en/animal health-in-the-world/technical-disease-cards/1.
31- OIE Terrestrial Manual (2010) , Chapter 2.1.12. — Q fever
32- Palmer S R, Young S E J (1982). Q fever endocarditis in Englandand Wales, 1975-1981. Lancet 2: 1448-1449.
33- Raoult D, Marrie T. (1995). Q Fever. Clin Infect Dis; 20: 489–96.

34- Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, et al.(2000). Q fever 1985–1998:Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. Medicine (Baltimore); 79: 109–23.
35- Raoult D,MegeJL,MarrieT: (2001). Qfever:Queries remaining after Decades of research, in S cheld WM, Craig WA, Hughes JM (eds): Emerging Infections 5. Washington, DC, AmericanSo-ciety of Microbiology Press, 26-56.
36- Raoult D. Q fever:(1996). still a query after all these years. J Med Microbi; 44: 77–78.
37- Reinthaler, F.F.; Mascher, F.; Sixl, W. and Arbesser, C/H. (1988): Incidence of Q fever among cattle, sheep and goats in the Upper Nile province in southern Sudan. Vet. Rec., 122(6): 137.
38- Richardus J, Donkers A, Dumas A.(1987). Q fever in the Netherlands:a sero-epidemiological survey among human population groups from 1968 to 1983. Epidemiol Infect; 98: 211–19.
39- Richardus J, Dumas A, Huisman J, Schaap G. (1985). Q fever in infancy: a review of 18 cases. Pediatr Infect Dis J; 4: 369–373.
40- Rolain J, Mallet M, Raoult D. (2003). Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with Coxiella burnetii endocarditis. J Infect Dis; 188: 1322–25.
41- Rolain JM, Maurin M, Raoult D.(2001). Bacteriostatic and bactericidal activities of moxifloxacin against Coxiella burnetii. Antimicrob Agents chemother;45:301-02.
42- Sawyer L, Fishbein D, McDade J.(1987). Q fever: current concepts.Rev Infect Dis; 9: 935–46.
43- Schimmer, B., Morroy, G., Dijkstra, F., Schneeberger, P.M., Weers-Pothoff, G., Timen, A., Wijkmans, C., van der Hoek, W., (2008). Large ongoing Q fever outbreak in the south of the Netherlands. Eur. Surveill. 13, 18939.
44- Sidi-Boumedine K., Rousset E., Henning K., Ziller M., Niemczuck K., Roest H.I.J. & Thiery R. (2010). Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511., 48 pp.
45- Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P.(1992). Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. Am J Med; 93: 427–34.
46- Voth D.E., and Heinzen R.A., Wilson H, Neilson G, Galea E, Stafford G, O'Brien M. Q fever endocarditis in Queensland. Circulation 1976; 53: 680–84.