**Assiut Vet. Med. J. Vol. 60 No. 143 October 2014**

# DETECTION OF Q FEVER IN HUMAN BY POLYMERASE CHAIN REACTION TEST (PCR)

V.M. MAHER ALHOURANI[*] A.A.EL-MONLA[**] and HIAAM BSHARA[***]

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

[**] Professor of Vet. Hgg. and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, AL-Baath University.

[***] Associated Prof. Dr. in Microbiology and immunity- Faculty of medicine, AL-Baath University

Email: drma97@yahoo.com

**ABSTRACT**

**Received at: 7/8/2014**

**Accepted: 16/11/2014**

Q fever is a rickettsial 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 two 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.

***Keywords:*** *Q fever, PCR test human, Zoonosis.*

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

***ماهر يوسف الحوراني ، عبد الله المنلا ، هيام البشارة***

Email: drma97@yahoo.com

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.

## INTRODUCTION
## المقدمـة

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 أمرٌ 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 لا تزال 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 and public health studies, 2007). وبحسب منظمّة الصحّة الحيوانيّة العالمية (OIE, 2012) فإن الحمّى المجهولة هو 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 and Raoult, 1999; Arricau-Bouvery and 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 and 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 الأنزيميّة ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ينبغي أن يعتبر طرقاً مختارة للتشخيص السريري (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010) ، كما أن اختبارات المقايسة المناعية المرتبط بالأنزيم ELISA ، وتثبيت المتممة تعد من الاختبارات المستخدمة بشكل روتيني (Maurin and 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 and Raoult, 1999) ، وأمّا 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 ، ومع الطور الأول عالي الفوعة يتغير المظهر إلى الطور الثاني غير المفوع ، وتبدي العزولات المأخوذة من مناطق مختلفة في العالم درجة منخفضة من التغايرية الجينية (Maurin and Raoult,1999, Raoult, 2001).

بالنسبة لانتشار الحمّى المجهولة فهو واسع جدّاً بسبب ظاهرة الانتشار عبر حمل الرياح (Windborne spread) (Boschini, *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).

**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 والتهاب الكبد، وغالباً ما يحصل الخطأ في التشخيص نظراً لأن الأعراض متنوّعة وهي غير محددة بدقة (McQuiston and Childs, 2002) and (Fournier *et al.*, 1998) ، (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 (Tissot-Dupont *et al.*,1992) and (De Alarcon *et al.*, 2003) ، 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 and Raoult, 1999) ، ولكن تضخم الكبد وارتفاع مقياس أنزيمات 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 ما تهاجم 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 فـوق 40 سنة ومعدل إماتـة الحالات في حمى كيـو الحـادة 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 and Marrie, 1995)، وتبين أنه في مرسيليا بفرنسا فإن ١٥% من حالات التهاب شغاف القلب ناتجة عن الكوكسيلّة البورنيتيّة (Marrie and Raoult, 1997) وتكون الحمى غائبة غالباً والنوابت الجرثومية (Vegetations) غائبة غالباً أو صغيرة (Marrie and Raoult, 1997)،( Lepidi *et al.*, 2003).

هناك ما معدله ١٢ شهر بين بداية المرض وتشخيصه (Marrie and Raoult, 1997). كل المرضى الّلذين ظهرت لديهم نتائج زرع سلبية لالتهاب شغاف القلب تم استثناؤهم من الإصابة بحمى كيو (Fournier *et al.*, 1998)، ويعد التهاب شغاف القلب قاتلاً ما لم 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 ما يكون قاتلاً عندما يحدث بين البالغين مع تواتر أكثر في الذكور من الإناث، ويتطور 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%)، وقدّرت إحدى الدراسات أن خطورة تطور التهاب الشغاف هي 39% بين المصابين بحمى كيو مع عيوب صمامية (Fenollar *et al.*, 2001).

## MATERIALS and METHODS
## مواد وطرائق العمل

**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 والمخبريّين 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، وقد 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 | | | | | | | | |

**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 إلى 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).

**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 الاستخلاص:

١- توضع الماسحة بعد اخراجها من التجميد في أنبوب تثفيل سعة ٢مل ونضيف ٤٠٠ميكرو ليتر من محلول PBS (PH=8.3) ويراعى إخراج محتويات الماسحة إلى 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 نقل٧٠٠ميكروليتر 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 ويضاف٥٠٠ميكوليتر 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 ـ 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 ـ 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.

**٢ـ 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 إلى المزيج ، ثم نرج الأنبوب بجهاز الفورتكس (Vortexing) لمدّة ١٥ ثانية.
٤- تحضين عند درجة حرارة ٥٦د مئويّة لمدّة ١٠ دقائق بمحم مائي.
٥- تثفيل بطيء لإنزال القطرات العالقة على الغطاء الداخلي للأنبوب.
٦- يضاف ٢٠٠ ميكروليتر من كحول الايتانول المطلق للمزيج ثم يتم الرج بالفورتكس ، ومن ثمّ تثفيل بطيء 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 إلى 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).

**٣ـالاختبار الرسمي للكشف عن الكوكسيلّة البورنيتيّة:**

**Conventional PCR for detecting of *Coxiella burnetii*:**
**(AccuPrime ® Taq DNA Polymerase)**

**١ـ 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) (Alsaleh *et al.*, 2011).

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

١ـ 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 أنزيم ال RNase (distilled RNase-free water) بقسمة (٥/١ 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 *et al.*, 2011)

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

– والتي تحوي أنزيم البُوليمِراز(Taq DNA Polymerase (0,25 µl (هو أنزيم 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 (deoxynucleotide triphosphates) (٢٠٠µM dNTP)، وهو مركّز ١٠ مرّات من شركة Qiagen الألمانية.

**٣ ـ** ماء مقطر خالي من DNAase:
ماء معقّم خال من أنزيم ال RNase (distilled RNase-free water)، استخدم في استخلاص قالب الدنا وفي تحضير مزيج التفاعل وقد تم الحصول عليه من شركة Qiagen الألمانية.

**٤ ـ** 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 ـ** الأغاروزAgarose
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 ـ** 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 ـ** 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 أنزيم (Taq polymeras) ، أو يتم رج الدارئ. يتم بعدها القيام بدوران سريع لتجميع كل القطرات المتكاثفة في الأنبوب وبعدها تترك المواد في الجليد. ويلاحظ ما سبق في الجدول التالي (٢):

**الجدول ٢:** 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 (٣).

**الجدول ٣:** 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 مايلي:

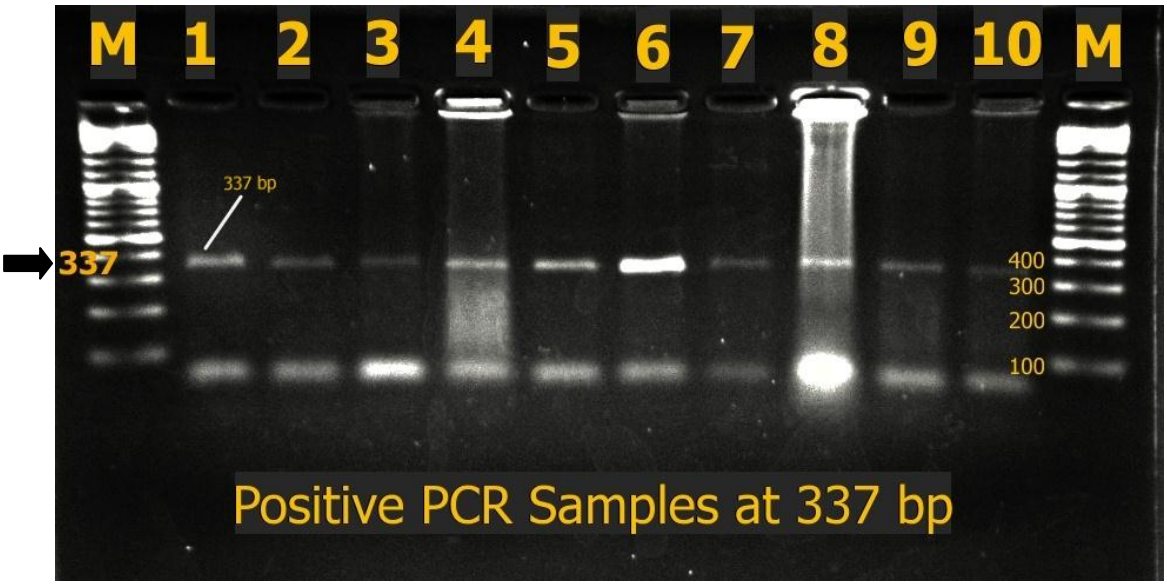
- من أجل الكميّة الصغيرة من الهلام يتم إضافة ٦٠ مل من محلول (1X TAE or TBE 1X) يتم إضافة ٠.٩ غرام من بودرة الأغاروز.
- من أجل الكميّة الكبيرة من الهلام يتم إضافة ١٠٠ مل من محلول (1X TAE or TBE 1X) يتم إضافة ١.٥ غرام من بودرة الأغاروز.
- يتم إذابة الأغاروز في المحلول بوضع الدورق في الميكروييف ، ويراعى 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 ما يعرف 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 إلى 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.

## DISCUSSION and RESULTS
## النتائــج والمناقشة

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 (١) مثالاً عن عيّنات تمّ أخذها والكشف عنها باختبار ال PCR:




**الصورة (١)**: 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) :

$$P \mp 1.96 \times SE(P) =$$

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

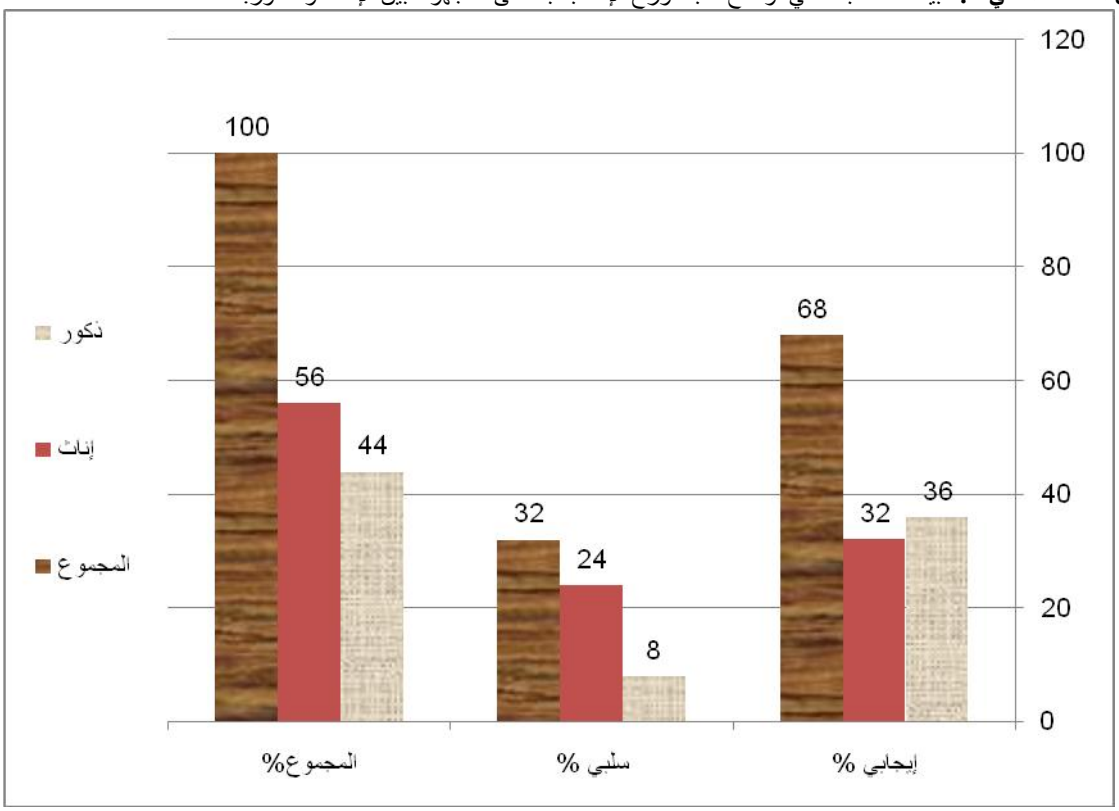
تم حساب قيمة الخطأ المعياري ( $SE(P) = 0,07$ ) وبناءً على القانون السابق وعلى اعتبار أن قيمة p = 0.68 فقد تم حساب حد الثقة وكان كما يلي:
(حد الثقة 95% الأعلى =0.77، حد الثقة 95% الأدنى =0.47)
ثم دققت النتائج من خلال استخدام نظم Access، وتم تصدير هذه البيانات لإجراء التحاليل الإحصائية والوبائية في نظام Statistics (Analytical Software@1998) النسخة ٢.٠.

تم التوصّل إلى 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 (٤):

**الجدول ٤:** 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 الإصابة بالحمّى المجهولة بين الإناث والذكور.



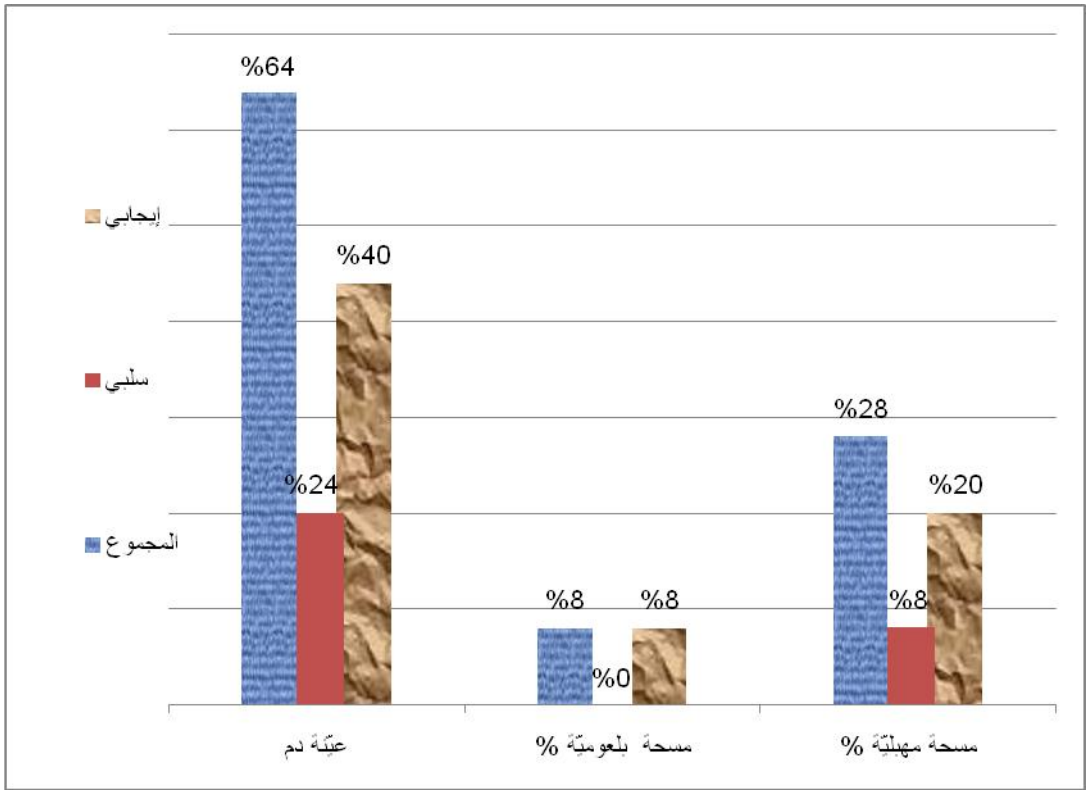

**المخطط (١):** نسبة توزّع الإصابة بالحمّى المجهولة بين الإناث والذكور

وبالنسبة لتوزّع النتائج بحسب نوع العيّنات فقد تم الحصول على النتائج الموضّحة في الجدول التالي (٥):

**الجدول ٥:** 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 الإصابة بالحمّى المجهولة حسب نوع العيّنة المأخوذة.



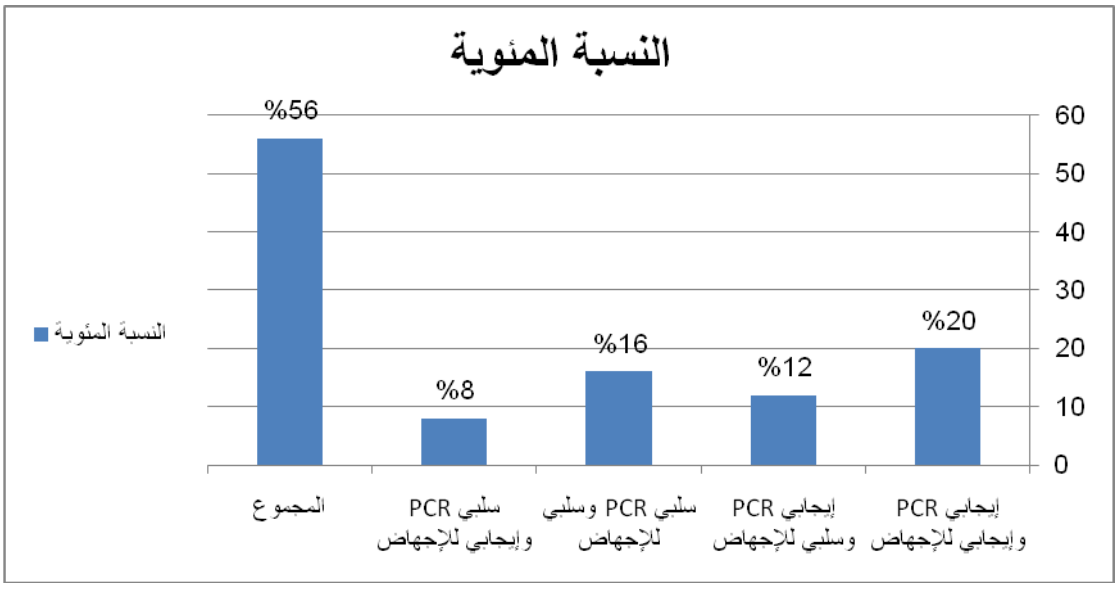

**المخطّط (٢):** البيانات بالنسب المئويّة لنسبة الإصابة بالحمّى المجهولة حسب نوع العيّنة المأخوذة

وبالنسبة للعلاقة بين الإجهاض والحمّى المجهولة فقد تم التوصّل للجدول التالي (٦) الذي يبيّن عدد ونسبة الحالات الإيجابيّة والسلبيّة للإجهاض ولاختبار PCR.

**الجدول ٦:** الذي يبيّن عدد ونسبة الحالات الإيجابيّة والسلبيّة للإجهاض ولاختبار PCR.

| | إيجابي PCR وإيجابي للإجهاض | إيجابيPCR 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 الإجهاض والحمّى المجهولة

حيث يبدو بوضوح وجود علاقة بين الإجهاض والإصابة 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 ما سبق فقد تبيّن أنّ نسبة الإصابة 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 ما يمكن وقد وجد هؤلاء أن نسبة (4,6%) من النساء المشمولات بالدراسة إيجابيات مصلياً لاختبار التألق المناعي غير المباشر (Indirect Immunofluorescence) وذلك للكشف عن أضداد الكوكسيلة 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.

## CONCLUSIONS and RECOMMENDATION
## الاستنتاجات والتوصيات

مرض الحمى المجهولة الذي تسببه جراثيم الكوكسيلة البورنيتية هو مرض موجود عند البشر في المنطقة الوسطى من القطر العربي السوري.
نسبة انتشار المرض مرتفعة بشكل كبير وواضح.

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

## REFERENCES
## المراجـع


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

*Alsaleh, A.; Pellerin, J-L.; Rodolakis, A.; Larrat, M.; Cochonneau, D.; Bruyas, J-F. and 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.

*Alton, G.G.; Jones, L.M. and Pietz, D.E. (1975):* Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. World Health Organization. Geneva.

*Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angurs, R.D. and Verger, J.M. (1988):* Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA. Paris, France.

*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.

*Arricau-Bouvery N. and Rodolakis A. (2005):* Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res., 3, 327–349.

*Baud, O. Peter; Langel, C.; Regan, L. and Greub, G. (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.

*Blasco, J.M. (1998):* A review of the use of Coxiella burnetii Vaccine in adult sheep and goats. Prev. Vet. Med. 34: 160-183.

*Boschini, A.; Di Perri, G. and 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.

*Carrieri, MP.; Tissot-Dupont, H. and 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.

*Center of food security and public health studies, (2007):* College of Veterinary Medicine lows state university Ames, lows 50011.1

*De Alarcon, A.; Villanueva, JL. and 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.

*Derrick, E. (1973):* The course of infection with Coxiella burnetii. Med J Aust; 1: 1051–57.

*Derrick E. and fever, Q. (1937):* A new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med J Aust; 2: 281–99.

*Dupuis, G.; Peter, O.; Pedroni, D. and Petite, J. (1985):* Clinical aspects observed during an epidemic of 415 cases of Q fever. Schweiz Med Wochenschr;115: 814–8.

*Dupuis, G.; Petite, J.; Peter, O. and Vouilloz, M. (1987):* An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. Int J Epidemiol; 16: 282–87.

*Fenollar, F.; Fournier, P.; Carrieri, MP.; Habib, G.; Messana, T. and Raoult, D. (2001):* Risk factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis; 33: 312–16.

*Fournier, P.; Marrie, TJ. and Raoult, D. (1998):* Diagnosis of Q Fever. J Clin Microbiol; 36: 1823–34.

*Fournier, PE.; Etienne, J.; Harle, JR.; Habib, G. and 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.

*Hilbink, F.; Penrose, M.; Kovacova, E. and Kazar, J. (1993):* Q fever is absent from New Zealand. Int J Epidemiol; 22: 945–49.

*Houwers, D.J. and Richardus, J.H. (1987):* Infection with Coxiella burnetii in man and animals in the Netherlands. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 267, 30–36.

*Kermode, M.; Yong, K.; Hurley, S. and 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.

*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.

*Lepidi, H.; Houpikian, P.; Liang, Z. and Raoult, D. (2003):* Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, histologic studies. J Infect Dis; 187: 1097–106.

*Levy, PY.; Carrieri, P. and Raoult, D. (1999):* Coxiella burnetii pericarditis: Report of 15 cases and review. Clin Infect Dis; 29: 393–97.

*Marrie, T J. (2003):* Coxiella burnetii pneumonia. Eur Respir J; 21(4): 713–9.

*Marrie, TJ. and Raoult, D. (1997):* Q fever—a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents; 8: 145–61.

*Maurin M. and Raoult D. (1999):* Q fever. Clin. Microbiol. Rev., 12, 518–553.

*McQuiston, JH. and Childs, JE. (2002):* Q fever in humans and animals in the United States. Vector Borne Zoonotic Dis; 2: 179–91.

*OIE Technical disease (2012*): www.oie.int/en/animal health-in-the-world/technical-disease-cards/1.

*OIE Terrestrial Manual (2010):* Chapter 2.1.12. ; Q fever

*Palmer, S R. and Young, S E J. (1982):* Q fever endocarditis in Englandand Wales, 1975-1981. Lancet 2: 1448-1449.

*Raoult, D. and Marrie, T. (1995):* Q Fever. Clin Infect Dis; 20: 489–96.

*Raoult, D.; Tissot-Dupont, H. and Foucault C. (2000):* Q fever 1985–1998: Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. Medicine (Baltimore); 79: 109–23.

*Raoult, D, Mege, JL. and Marrie, T. (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.

*Raoult, D.Q. fever: (1996):* still a query after all these years. J Med Microbi; 44: 77–78.

*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.

*Richardus, J.; Donkers, A. and 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.

*Richardus, J.; Dumas, A.; Huisman, J. and Schaap, G. (1985):* Q fever in infancy: a review of 18 cases. Pediatr Infect Dis J; 4: 369–373.

*Rolain, J.; Mallet, M. and Raoult, D. (2003):* Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with Coxiella burnetii endocarditis. J. Infect Dis; 188: 1322–25.

*Sawyer, L.; Fishbein, D. and McDade, J. (1987):* Q fever: current concepts.Rev Infect Dis; 9: 935–46.

*Schimmer, B.; Morroy, G.; Dijkstra, F.; Schneeberger, P.M.; Weers-Pothoff, G.; Timen, A.; Wijkmans, C. and van der Hoek, W. (2008):* Large ongoing Q fever outbreak in the south of the Netherlands. Eur. Surveill. 13, 18939.

*Sidi-Boumedine, K.; Rousset, E.; Henning, K.; Ziller, M.; Niemczuck, K.; Roest, H.I.J. and 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.

*Tissot-Dupont, H.; Raoult, D. and Brouqui, P. (1992):* Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. Am J Med; 93: 427–34.

*Voth, D.E. and Heinzen, R.A. (2007):* Lounging in a lysosome: The intracellular lifestyle of Coxiella burnetii Cellular Microbiology 9 (4): 1829–840.

*Wilson, H.; Neilson, G.; Galea, E.; Stafford, G. and O'Brien, M. (1976):* Q fever endocarditis in Queensland. Circulation; 53: 680–84.