دراسة بكتيرية على خمج المفاصل المتخفي المزمن في محافظة بابل

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة.

افراح حاتم عمران

٢٠٠٦

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿إن الله لا يخفى عليه شيء في الأرض ولا في السماء﴾

صدق الله العظيم

سورة ال عمران- الاية (٥)

شكر وتقدير

أتقدم بالشكر الجزيل الى أستاذي الفاضل الدكتور قاسم نجم عبيد ثويني لإشرافه على البحث وحرصه الشديد على إنجازه بأتم وجه بما قدمه لي من آراء سديدة في هذا الجانب. وأتقدم بالشكر والامتنان والعرفان الى الدكتور إبراهيم محمد سعيد شناوة لتوجيهاته ونصائحه القيمة التي قدمها لي طوال مدة البحث أسال الله العلي القدير لهما دوام الصحة والتوفيق. وأتقدم بالشكر والامتنان الى رئاسة قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم ورئاسة جامعة بابل لتقديمهم التسهيلات التي ساهمت في إكمال دراستي. وأتقدم بخالص الشكر الى الدكتور سمير العميدي والدكتور صباح الربيعي وجميع الأطباء المقيمين الاقدمين في استشارية المفاصل والعاملين في مختبرات مستشفى مرجان التخصصي ومستشفى الحلة الجراحي/قسم الاحياء المجهرية والمقاطع النسيجية لمساعدتهم لي في الحصول على العينات. كما واشكر الدكتور اسعد الجنابي لمساعدته لي في تشخيص المقاطع النسجية وتصويرها. وكل الشكر للأخت ايفان والإخوة في وحدة التصوير المجهري في قسم علوم الحياة/جامعة بابل. كما أود ان اشكر السيد نصير والأخت فريال والأخت ازهار وزملائي طلبة الدراسات العليا ممن ابدوا العون والمساعدة ولاسيما الأخوات هبة وشيماء وداليا مع تمنياتي للجميع بالموفقية.

افراح

توصية الأستاذ المشرف

أشهد ان إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة.

اسم المشرف: د. قاسم نجم عبيد ثويني

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم- جامعة بابل

التوقيع:

التاريخ: / / ٢٠٠٦

توصية رئيس القسم

إشارة الى التوصية أعلاه المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

الاسم: د. كريم حميد رشيد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم- جامعة بابل

التوقيع:

التاريخ: / /٢٠٠٦

الخلاصة

تم جمع ٣٠ عينة سائل مفصل الركبة من مرضى خمج المفاصل تراوحت اعمارهم بين ٢٠-٧٠سنة ومن كلا الجنسين اذ كانت نسبة الاصابة في الذكور٤٣.٣٣% بينما في الاناث٥٦.٦٦%ممن راجعوا مستشفى مرجان التخصصي و مستشفى الحلة التعليمي العام وكانت ٥٠% من العينات موجبة الزرع باستخدام تقنيات محورة و٥٠% منها سالبة الزرع، فالموجبة قسم منها فاقدة للجدار وبنسبة ٢٣.٣% وقسم مشتركة الخمج (فاقدة الجدار وذات الجدار) ٢٠% وذات الجدار ٦.٦٥%.

صبغت مسحات سائل المفصل بصبغة ليشمان لدراسة الاستجابة الخلوية غير المتخصصة وأظهرت أغلبية واضحة لوحيدات النواة ٢٩.٩٥%. جرى زرع سائل المفصل بسبع طرق وتندرج هذه الطرق ضمن ثلاث تقنيات:١-الزرع المتسلسل وتشمل: سائل المفصل الكامل، الراسب والرائق بعد النبذ ، الراسب والرائق بعد التكسير ٢- الراشح المخفف ٣-المزرعة ثنائية الطور.

وظهر المسبب المرضي بخمس حالات مفسرة وسادسة غير مفسرة أي المسبب في هذه الحالةلا يمكن عزله باستخدام التقنيات المتاحة وبذلك يصعب تحديد موضعه، وهذه التقنيات مكنتنا من التحري عن موضع البكتريا فاقدة الجدار في واحد من المواقع الآتية:سائل المفصل الكامل، الرائق بعد النبذ، سطح الخلايا القيحية و داخل الخلايا القيحية.

وتبين ان المزرعة ثنائية الطور وطريقة الراسب المكسر هما افضل الطرق لعزل مسببات خمج المفاصل مقارنة بالطريقة الروتينية كما بينها اختبار Z. ومن اغلب المسببات البكتيرية شيوعاً هي العنقوديات الذهبية بنسبة ٢٠.٠٥% واشريكيا القولون بنسبة ١٣.٣% فالكليبسيلا الرئوية بنسبة ١٠%، ثم المسبحيات القيحية ووتديات الخناق بنسبة ٣.٣%.

وجرى دراسة الحساسية الدوائية للمسببات الفاقدة الجدار وذات الجدار للخمج السريري فكانت البكتريا الموجبة لصبغة غرام حساسة للكلورامفينكول والستربتومايسين والتتراسايكلين وبنسبة ٦٦.٧% لكل منهما، بينما البكتريا السالبة لصبغة غرام حساسة للنالدكسيك أسد وبنسبة ٧٥%. وجرى دراسة تجريبية لخمج المفاصل بحقن العالق الجرثومي لاثنين من اغلب المسببات المشاركة في الخمج (المكورات العنقودية الذهبية واشريكيا القولون) في الأرانب وبطريقتي الحقن وريدياً وموضعياً بالمفصل فكانت الأعراض واضحة على الحيوانات المحقونة موضعياً أكثر مما عليه في المحقونة عبر الوريد، اذ اظهرت تورم المفصل، فقدان الوزن والعرج بصورة واضحة، وعزلت البكتريا من سائل المفصل للحيوانات

المخمجة وصبغت بصبغة غرام وصبغة ليشمان وأجريت لها دراسة نسيجية فكان الضرر النسيجي لغشاء المفصل في تجربة الحقن بالمفصل أكثر وضوحاً مما هي عليه في تجربة الحقن الوريدي.

Summary

٣٠ samples of synovial fluids were collected from patients who were referea to Margan specialized hospital & Hilla Hospital of both sexes (٤٣.٣٣ males & ٥٦.٦٦ females) and of different ages (٢٠-٧٠) years from December ٢٠٠٤ to September ٢٠٠٥. The results indicated that ٥٠ % of samples revealed positive results with use of developed methods in this study. While ٥٠% gave negative results, the positive results were grouped in categories, the first was **(**CWDB**)** with percentage (٢٣.٣٪), the second was mixed (CWDB& CWB) and accounted for ٢٠٪, and third group was (CWB) with a percentage of ٦.٦٥٪.

The non specific cellular immune response was studied by staining with leishman stain, since the monocyte revealed predominant. Each sample was cultured by seven methods, These methods lies in three techniques; ١- serial culture it contains :whole synovial fluid , sediment and superate after centrifugation , sediment and superate after lysing

٢- dilution technique , ٣- biphasic media .

The pathogen was found to localize in five interpretate patterns and one uninterpretated pattern that the causative agent couldn't be isolated by the available techniques. However by using these technique **(**CWDB**)** were found to harbour in one of following locations:-

Whole Synovial fluid, Superate after centrifugation, Surface of pus cells and inside the pus cells.

The results indicated that the biphasic media & lysing sediment were the best techniques in identification of chronic arthritic pathogens in comparative with routine method.

The more bacterial causes in this study were *Staphylococcus aureus* with a percentage of (٢٠.٠٥ %), followed by *E.coli* (١٣.٣٪), *Klebsiella pneumoniae* (١٠ %), *Streptococcus pyogenes* & *Corynebacterium diphtheriae* (٣.٣٪).

The antibiotic sensitivity was studied in both **(**CWDB& CWB**)** that isolated from clinical samples. It was found that gram positive bacteria were sensitive to Chloramphenicol, Streptomycin & Tetracycline with a percentage of ٦٦.٧% in each one. While gram negative bacteria were sensitive to Nalidixic acid with a percentage of ٧٥٪. Lastly experimental bacterial arthritis was studied by injection of *S. aureus* & *E. coli* in rabbit males in two methods (intravenously & intra- articularly). The symptoms being appeared were more clear in intra-articular injected animals. The synovial fluid of experimentally infected joints of these animals was drawn & studied by stain it with gram & leishman stains. Histopathology of infected animal joints was also investigated, since the study found that the tissues at joints being directly infected were severely damaged compared with that joints of animals being intravenously infected.

.

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
I	الخلاصة بالعربية
II	قائمة المحتويات
VIII	قائمة الجداول
X	قائمة الاشكال
١	الفصل الاول : المقدمة
	الفصل الثاني: استعراض المراجع
٣	استعراض المراجع
٣	٢-١ : نظرة تشريحية للمفاصل
٥	٢-٢ : التهاب المفاصل وانواعه

٢-٢-١: التهاب المفاصل	٥
٢-٢-٢: انواع التهاب المفاصل	٥
٢-٣: طرق او مصادر الاصابة	٧
٢-٤: العوامل الممهدة للاصابة بخمج المفاصل	٨
٢-٥: امراضية التهاب المفاصل المايكروبي	٩
٢-٦: البكتريا فاقدة الجدار	١٢
٢-٦-١: خواص البكتريا فاقدة الجدار	١٢
٢-٦-٢: البكتريا فاقدة الجدار والمناعة	١٣
٢-٦-٣: البكتريا فاقدة الجدار وعلاقتها بخمج المفاصل	١٤
٢-٧: المسببات المشاركة في التهاب المفاصل	١٤
٢-٨: المضادات الحياتية	١٨
٢-٨-١: المضادات الحياتية وعلاج خمج المفاصل	١٨
٢-٨-٢: مضادات حيوية جديدة قد تستخدم في علاج خمج المفاصل	٢٠
٢-٨-٣: عوامل المضيف التي تؤدي الى اختلاف تأثير المضادات الحياتية على المرضى	٢١

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
٢-٨-٤: عوامل الممرض التي تساعد على فشل فعل المضاد	٢١
٢-٩: النموذج التجريبي لخمج المفاصل	٢١
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	٢٣
٣-١: المواد	٢٣
٣-١-١: الكواشف المستخدمة	٢٣
٣-١-٢: المحاليل المستخدمة	٢٤
٣-١-٣: الصبغات	٢٤
٣-١-٤: الاوساط الزرعية	٢٦
٣-١-٥:عدة التشخيص المصلي لبكتريا *Streptococcus pyogenes* نمط A	٢٧
٣-٢-١: جمع العينات	٢٧
٣-٢-٢: مخطط العمل البحثي	٢٨
٣-٢-٢-١: التصبيغ بصبغة لشيمان	٢٩
٣-٢-٢-٢: زرع العينات	٢٩
٣-٢-٣: التعرف والتشخيص	٣٠

٣-٢-٣-١الوصف المظهري	٣١
٣ــ٢-٣-١-١: تقنية غطاء الشريحة	٣١
٣-٢-٣-١-٢: تقنية قالب الاكار	٣١
٣-٢-٣-٢: الوصف الزرعي	٣٢
٣-٢-٣-٣: الفحوصات الكيموحيوية	٣٢
٣-٢-٣-٤: التشخيص المصلي لبكتريا *Streptococcus pyogenes* نمط A	٣٤
٣-٢-٣-٥: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	٣٥
٣-٢-٣-٥-١: اختبار حسا سية البكتريا فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	٣٥
٣-٢-٤: التحليل الاحصائي	٣٧

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
٣-٢-٥: موديل تجريبي لخمج المفاصل في الارنب	٣٧
٣-٢-٥-١: الحيوانات المختبرية	٣٧
٣-٢-٥-٢: حث فقد الجدار بالبنسلين	٣٧
٣-٢-٥-٣: تحضير العالق الجرثومي	٣٨
٣-٢-٥-٣-١: تحضير العالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية واشريكيا القولون ذات الجدار	٣٨
٣-٢-٥-٣-٢: تحضير العالق الجرثومي للمكورات العنقودية واشريكيا القولون فاقدة الجدار	٣٩
٣-٢-٥-٤: حقن الحيوانات المختبرية	٣٩
٣-٢-٥-٤-١: الحقن بالوريد	٣٩
٣-٢-٥-٤-٢: الحقن الموضعي بالمفصل	٤٠
الفصل الرابع : النتائج	٤٣
٤-١ الخمج العفوي	٤٣
٤-١-١: الفحص المباشر لمسحات رسابة سائل المفاصل المصبوغة بصبغة ليشمان	٤٣
٤-١-٢:الوصف المزرعي للمزارع الاولية	٤٣
٤-١-٢-١:تقنيات زرع البكتريا فاقدة الجدار	٤٣
٤-١-٢-٢: الوصف المزرعي للبكتريا فاقدة الجدار	٥١
٤-١-٣ :الوصف المزرعي للمزارع الثانوية	٥٤
٤-١-٤: دورة حياة البكتريا فاقدة الجدار في خمج المفاصل المزمن	٥٤
٤-١-٥المسببات البكتيرية المشاركة في خمج المفاصل المزمن وعلاقتها بالجنس	٥٥
٤-١-٦: الحساسية الدوائية للبكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار المعزولة من مرضى خمج المفاصل.	٥٦

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
٤-١-٦-١: الحساسية الدوائية للبكتريا الموجبة لصبغة گرام	٥٦
٤-١- ٦-٢: الحساسية الدوائية للبكتريا السالبة لصبغة گرام	٥٦
٤ -١-٧ :قرائن اختيار سلالات الخمج التجريبي	٥٧
٤-٢: الخمج التجريبي	٦٠
٤-٢-١مظاهر الخمج وعلامات المرض التجريبي	٦٠
٤-٢-١-٢: علاقة الخمج البكتيري التجريبي مع ظهور الاعراض على الارانب المخمجة	٦١
٤-٢-١-٢ -١ تجربة الحقن بالوريد	٦١
٤-٢-١-٢-٢: تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٦١
٤-٢-٢:الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة غرام لسائل المفصل المسحوب من مفاصل الحيوانات المصابة.	٦٤
٤-٢-٢-١: في تجربة الحقن الوريدي	٦٤
٤-٢-٢-٢: في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٦٧
٤ -٢-٣: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة ليشمان لرسابة سائل المفصل المسحوب من الحيوانات المصابة	٧١
٤-٢-٣-١: في تجربة الحقن الوريدي	٧١
٤-٢-٣-٢: في تجربة الحقن الموضعي في المفصل	٧١
٤-٢-٤الفحص النسيجي للغشاء المفصلي للارانب المصابة تجريبيا	٧١
٤-٢-٤-١ تجربة الحقن بالوريد	٧١
٤-٢-٤-٢: تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٧٢
الفصل الخامس: المناقشة	٧٩
٥-١: الخمج العفوي للمفاصل	٧٩
٥-١-١: الفحص المباشر لمسحات رسابة سائل المفاصل المصبوغة بصبغة ليشمان	٧٩

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
٥-١-٢: تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة في خمج المفاصل	٧٩
٥-١-٣:صفات البكتريا فاقدة الجدار الخلوي	٨١
٥-١-٤: جدوى استخدام تقنيات محورة لعزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من	٨٢

سائل المفصل	
٥-١-٥: المسببات البكتيرية المشاركة في خمج المفاصل المزمن وعلاقتها بالجنس	٨٢
٥-١-٦: الحساسية الدوائية للبكتريا المسببة لخمج المفاصل	٨٤
٥-٢: الخمج التجريبي للمفاصل	٨٥
٥-٢-١: تأثير الخمج التجريبي على وزن الارانب	٨٥
٥-٢-٢: الاعراض المرضية المرافقة لخمج المفاصل التجريبي	٨٥
٥-٢-٣: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة غرام لسائل المفصل المسحوب من مفاصل الارانب المخمجة تجريبياً	٨٦
٥-٢-٤: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة ليشمان لرسابة سائل المفصل المسحوب من مفاصل الارانب المخمجة تجريبياً	٨٧
٥-٢-٥: الفحص النسيجي لاغشية المفاصل للارانب المخمجة تجريبيا	٨٧
٥-٢-٥-١: تجربة الحقن عبر الوريد	٨٧
٥-٢-٥-٢: تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٨٨
الاستنتاجات	٨٩
التوصيات	٨٩
المصادر العربية	٩٠
المصادر الاجنبية	٩١
الخلاصة باللغة الانكليزية	A

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
٣-١	المضادات الحيوية المستخدمة واقطار تثبيطها ومديات مقاومتها.	٣٦
٣-٢	حقن الحيوانات المختبرية بالعالق الجرثومي.	٤٠
٤-١	مدى الاستجابة المناعية الخلوية غير المتخصصة في مرضى المفاصل.	٤٣
٤-٢	نسبة الاصابة بالمسببات البكتيرية في ٣٠ عينة من مرضى خمج المفاصل المزمن.	٤٤
٤-٣	المجموعة ١ وهي موجبة الزرع في جميع التقنيات	٤٥
٤-٤	المجموعة ٢ وهي سالبة الزرع في المراحل الاربع الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لبقية التقنيات	٤٦
٤-٥	المجموعة٣ وهي سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة في تقنيات التخفيف والمزرعة ثنائية الطور	٤٧
٤-٦	المجموعة ٤ وهي موجبة الزرع في تقنية الزرع المتسلسل ما عدا الخطوة الاولى والمزرعة ثنائية الطور وسالبة في تقنيات التخفيف	٤٨
٤-٧	المجموعة ٥ وهي سالبة الزرع في المرحلتين الاوليتين من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لبقية التقنيات	٤٩

٤-٨	المجموعة ٦ وهي سالبة الزرع في التقنيات كلها	٥٠
٤-٩	خواص البكتريا فاقدة الجدار.	٥١
٤-١٠	استخدام تقنيات محورة لزرع سائل المفصل	٥٣
٤-١١	استخدام طرائق الزرع المختلفة بالمقارنة مع زرع سائل المفصل كله بتطبيق اختبار احصاء Z.	٥٣
٤-١٢	توزيع المسببات البكتيرية المرافقة لخمج المفاصل المزمن حسب الجنس.	٥٥

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
٤-١٣	اختبار حساسية البكتريا الموجبة لصبغة گرام الفاقدة للجدار وذات الجدار للمضادات الميكروبية.	٥٨
٤-١٤	اختبار حساسية البكتريا السالبة لصبغة گرام للمضادات الحيوية.	٥٩
٤-١٥	يوضح تأثير الخمج التجريبي على وزن الحيوانات طوال مدة التجربة.	٦٠

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
٢-١	تشريح مفصل الركبة	٤
٢-٢	الية خمج المفاصل.	١٢
٣-١	مخطط العمل البحثي	٢٨
٣-٣	حث فقد الجدار بالبنسلين	٣٨
٤-١	شكل المستعمرات لبكتريا اشريكيا القولون فاقدة الجدار الغير مصبوغة على قوة تكبير ٤٠ x.	٥٢
٤-٢	المخطط العام لدورة حياة البكتريا فاقدة الجدار في خمج المفاصل.	٥٦
٤-٣	وجود حالة العرج في الحيوان المصاب عند الحقن الموضعي عبر المفصل.	٦٣
٤-٤	عدم وجود حالة العرج في حيوان السيطرة.	٦٣
٤-٥	وجود حالة الورم في مفصل الحيوان المصاب عند الحقن الموضعي عبر المفصل.	٦٣
٤-٦	عدم تورم مفصل حيوان السيطرة.	٦٣
٤-٧	المدامج الخلوية للعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفاصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة ١٠٠X.	٦٦
٤-٨	المدامج الخلوية لاشريكيا القولون الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة ١٠٠X.	٦٦
٤-٩	بكتريا اشريكيا القولون ذات الجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة ١٠٠X.	٦٧

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
٤-١٠	المدامج الخلوية للمكورات العنقودية الذهبية الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X ١٠٠.	٦٧
٤-١١	المدامج الخلوية لاشريكيا القولون الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X١٠٠.	٦٨
٤-١٢	بكتريا اشريكيا القولون ذات للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X١٠٠.	٦٨
٤-١٣	نسيج غشاء المفصل للارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية فاقدة الجدار في تجربة الحقن بالوريد	٧١
٤-١٤	نسيج غشاء المفصل للارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار في تجربة الحقن بالوريد	٧٢
٤-١٥	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار في تجربة الحقن بالوريد	٧٣
٤-١٦	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية فاقدة الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٧٤
٤-١٧	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية فاقدة الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٧٥

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
٤-١٨	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار في تجربة الحقن الموضعي في المفصل	٧٦
٤-١٩	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل	٧٧
٤-٢٠	نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون ذات الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل.	٧٨

الفصل الاول Chapter One

المقدمة Introduction

يصاب الكثير من الاشخاص بالتهاب المفاصل المزمن الذي ينتج عن عدد من الاسباب التي قد تكون تغيرات كيمياوية في الغضاريف المغطية للعظام او تغيرات فيزياوية كحدوث ضربة شديدة بالمفصل او حمل ثقل معين او اسباب مناعية او فسلجية والمهم والاخطر من كل هذه التغيرات هو

حدوث اصابة ميكروبية تؤدي الى خمج المفاصل المزمن في كثير من الحالات، لكن غالباً ما تكون الاختبارات الروتينية لسائل المفاصل المسحوب من مرضى خمج المفاصل ذات نتائج سالبة وقد يعزى السبب الى عدة امور: منها تخفي المسبب المايكروبي بطريقة او باخرى ومن ثم اعطاء نتائج زرعية سالبة وعدم ملاءمة الاوساط الزرعية المستعملة للكشف عن المتخفيات، احاطة الخلايا البكتيرية بالاجسام المضادة، او هروب المايكروب من المضادات الحيوية التي قد يتعاطاها المريض (Sibilia & Limbach, ٢٠٠٢; Wilkinson, ١٩٩٩).

ان اغلب المسببات المايكروبية هي مسببات بكتيرية لخمج المفاصل كما ذكر Lehtonen وجماعته(١٩٩٤) بأن اغلب التهابات المفاصل غير المعروفة السبب هي ذات اصل بكتيري مثل التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid arthritis) الذي ربما يحفز او يتسبب من بكتريا متخفية بفقدها الجدار الخلوي كلياً او جزئياً ولكن هذه البكتريا لا يمكن عزلها وتشخيصها بالطرق الروتينية الشائعة دائماً وانما تحتاج الى طرق خاصة . كما ان مستضدات هذه البكتريا ممكن ان تسبب هذا النوع من الخمج (Kempsell *et al.*, ٢٠٠٠; Zhang *et al.*, ٢٠٠١; Schrijver *et al.*, ٢٠٠١).

كما ان هناك نوعاً آخر من الخمج لا يحدث بسبب الاجسام البكتيرية فقط وانما عن طريق الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) والرايبوزي (RNA) لهذه البكتريا بالامكان ان يسبب ما يعرف بخمج المفاصل المتفاعل المزمن (Chronic reactive arthritis) والذي يحدث بسبب وجود اصابة بكتيرية في مناطق مختلفة من الجسم مثل أخماج المجاري البولية، العيون، القناة التناسلية والقناة التنفسية وغيرها (Toivanen and Toivanen, ١٩٩٩; Wilkinson *et al.*, ١٩٩٩; Gaston, ٢٠٠٠; Jendro *et al.*, ٢٠٠٠; Locht & Krogfelt, ٢٠٠٢; Zou *et al.*, ٢٠٠٣).

ان البكتريا المسببة لخمج المفاصل المزمن تتبع سبلاً متعددة في احداث امراضيتها ولاسيما المتخفية منها مثل: التحوير المستضدي اذ تقوم بانتاج بروتينات محورة مناعياً للهروب من الجهاز المناعي للمضيف او تتموضع داخل الخلايا البطانية وذلك لتهرب من تأثير المضادات الحياتية عليها وقد تسلك ما يعرف بالتشابه الجزيئي مثل تشابه بروتين المضيف مع المسبب المرضي، او تحث ما يعرف بالتهاب المفاصل المناعي الذاتي وغيرها من الاساليب التي تتبعها البكتريا للبقاء داخل المفصل بشكل مزمن (Sibilia & Limbach, ٢٠٠٢).

ان المسببات البكتيرية الاكثر شيوعاً لخمج المفاصل هي المكورات العنقودية الذهبية وقد يعود السبب في ذلك الى وجود مستلمات خاصة لها في انسجة المفاصل وامتلاكها لعوامل ضراوة متعددة تمكنها من اختراق انسجة المفاصل واحداث الاصابة (Egidija & Collins, ٢٠٠٢).

تهدف الدراسة الى:

١. توظيف تقنيات محورة لزرع سائل المفصل باستعمال تقنية الزرع المتسلسل والتخفيف والمزرعة ثنائية الطور.
٢. عزل البكتريا المتخفية (فاقدة الجدار) وذات الجدار المسببة للخمج.
٣. رسم دورة حياة البكتريا الفاقدة للجدار المرافقة لخمج المفاصل.
٤. تحديد طبيعة الاستجابة الخلوية غير المتخصصة في خمج المفاصل البكتيري.
٥. مقارنة الحساسية الدوائية لفاقدة الجدار وذات الجدار.

٦.دراسة الخمج البكتيري للمفاصل تجريبياً بطريقة الحقن عبر الوريد وطريقة الحقن موضعياً.

الفصل الثاني Chapter Two

استعراض المراجع Literature Review

٢-١: نظرة تشريحية للمفاصل Joint Anatomical Overview

ان كل عظم في الجسم يشكل مفصلاً مع عظم اخر (واحد على الاقل)، ولذلك فأن وظيفة المفصل هي ربط العظام معاً والحفاظ عليها واعطاء الهيكل الصلب للعظم القابلية على الحركة. ويمكن ان تصنف المفاصل حسب تركيبها الى ثلاثة انواع:

١. المفاصل الليفية (Fibrous Joints)

في المفاصل الليفية ترتبط العظام مع بعضها بواسطة نسيج ليفي مثل مفاصل عظام الجمجمة (Skull Sutures) في هذه المفاصل تتداخل الحافات غير المنتظمة للعظام وترتبط بقوة بواسطة الياف النسيج الرابط ولاتسمح للعظام بالحركة ولذلك تسمى بالمفاصل الثابتة (Marieb, ٢٠٠٦).

٢. المفاصل الغضروفية (Cartilaginous Joints)

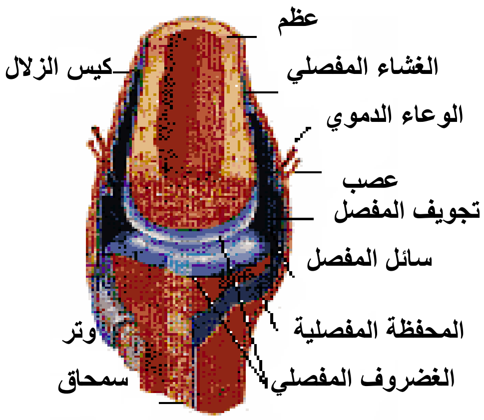
في المفاصل الغضروفية ترتبط العظام مع بعضها بواسطة الغضاريف، مثل مفاصل عظام الحوض والمفاصل بين فقرات العمود الفقري، حيث ان سطوح العظام المفصلية ترتبط بواسطة الاقراص بين الفقرات وهذه الاقراص مكونة من غضروف ليفي، وهناك مفاصل اخرى تحتوي على الغضروف الزجاجي يربط بين تلك العظام وتتميز هذه المفاصل بضعف الحركة (Marieb, ٢٠٠٦).

٣. المفاصل السلسة او المنزلقة (Synovial Joints)

في هذا النوع من المفاصل تفصل النهايات العظمية عن بعضها بواسطة تجويف او فراغ المفصل الذي يحتوي على سائل المفصل وهذا النوع من المفاصل موجود في جميع الاطراف ويتميز بحرية الحركة مثل مفصل الركبة بين عظمي الفخذ والساق كما في الشكل (٢-١). ويمتلك هذا النوع من المفاصل اربع خصائص مشتركة وهي:-

١- الغضروف المفصلي (Articular cartilage) وهو غضروف زجاجي يغطي نهايات العظام مكوناً المفصل.
٢- المحفظة الليفية المفصلية (Fibrous articular capsule): ان سطوح المفاصل محاطة بمحفظة من نسيج ليفي رابط وهذه المحفظة مبطنة بغشاء مفصلي رخو او ناعم وهذا هو السبب الذي يعزى اليه تسمية هذا النوع من المفاصل بالمفاصل السلسة او المنزلقة.
٣- تجويف او فراغ المفصل: ان المحفظة المفصلية محيطة بتجويف يدعى بتجويف او فراغ المفصل الذي يحتوي على سائل المفصل الذي يدعم المفصل بالتغذية والانزلاق.
٤- الاربطة التي تدعم وتعطي القوة والاسناد للمحفظة المفصلية ولذلك تسمى بالاربطة الساندة (Reinforcing ligaments)، كما تحتوي هذه المفاصل على ما يعرف بكيس الزلال المصلي (Bursae) والتي هي عبارة عن اكياس ليفية مسطحة مبطنة بغشاء المفصل وتحتوي على كمية قليلة من سائل المفصل وتلتف حول الاوتار (Tendons) وتعمل على منع الاحتكاك بين العظام (Marieb, ٢٠٠٦)، ويمكن تعريف سائل المفصل (Synovial fluid) بأنه سائل لزج يفرز في تجويف المفصل يعمل على انزلاق المفصل، يحتوي على خلايا مفصلية تفرز بروتينات الهيالارونيت (Hyaluronate) والبروتوكلايكيت (Proteoglycate)، حيث يكون هذا السائل في الحالة الطبيعية قليل الحجم لزجاً جداً ويعود ذلك الى وجود بروتين الهيالارونيت ذي الجزيئات الكبيرة، ذي لون صافي او عديم اللون الى اصفر باهت، اما في حالة الالتهاب فيزداد حجمه وتقل لزوجته بسبب تحطم هيالارونيت بروتيز ويصبح ذو لون معتم (Doherty *et al.*, ٢٠٠٢).

شكل (٢-١): تشريح مفصل الركبة.



٢-٢: التهاب المفاصل وانواعه Arthritis & its types

٢-٢-١: التهاب المفاصل (Arthritis)

هو التهاب يصيب المفصل وغالباً ما يرافقه تحطم المفصل، مصحوب بألم وورم وتثخن ينتج من اصابة مايكروبية وصدمة تحدث للمفصل وتغيرات تمزقية واختلالات ايضية او اسباب مناعية ذاتية او اسباب اخرى (Austin, ٢٠٠٥).

٢-٢-٢: انواع التهاب المفاصل (Types of arthritis)

١-التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid arthritis)

هو مرض التهابي مزمن يؤثر على المفاصل والانسجة المحيطة بها وكذلك يمكن ان يؤثر على الاجهزة الجسمية الاخرى، اسبابه غير معروفة بالرغم من انه يتطلب مهاجمة الخلايا المناعية للجسم ويسمى مرض مناعي ذاتي (Autoimmune disease)، وهناك حالات مختلفة ذات اسباب مختلفة قد تكون خمجية (Infectious) او عوامل وراثية او هرمونية. يشخص هذا الالتهاب بتمزق المفصل ويقترح وجود بروتين الـ Ostopontin الذي له دور في الاستجابة المناعية التي تسهل هذا التحطم (Yamamoto, ٢٠٠٣). ويعتقد بأن بداية حدوث التهاب المفاصل الرثوي تعزى الى التعرض الى حوافز بيئية مثل الاصابات البكتيرية وهذه التأثيرات مازالت موقع جدل، وقد تكون هذه البكتريا حية او الاحماض النووية لهذه البكتريا، او قد تكون فاقدة للجدار جزئياً او كلياً او اشكال L-forms وهذه الكائنات من الصعب تنميتها بالطرق الروتينية بسبب حساسيتها الازموزية، لكن باستخدام تقنية PCR تم الحصول على الـ DNA لهذه البكتريا المسببة لالتهاب المفاصل، وبقيت هذه البكتريا واصابتها للمفاصل موضع اهتمام الباحثين وجدلهم (Kempsell *et al.*, ٢٠٠٠).

٢- التهاب المفاصل العظمي (Osteoarthritis)

هو مرض مزمن يؤثر على المفاصل السلسة او الانزلاقية (Synovial joints) ولاسيما في المفاصل الكبيرة، وهو من الامراض الشائعة في كبار السن لكن يمكن ان يحدث في الشباب او يكون وراثياً او قد يحدث نتيجة حدوث صدمة سابقة للمفصل (Stitik *et al.*, ٢٠٠٤).

٣- التهاب المفاصل المايكروبي (Microbial arthritis) او الخمجي (Septic arthritis)

وهو على ثلاثة انواع حسب المسبب المايكروبي:

أ- خمج المفاصل الفطري (Fungal arthritis)

تعد الفطريات من المسببات الاقل شيوعاً في التهاب المفاصل، التهاب المفاصل بالفطريات يكون بطيئاً جداً، ان انواع الفطريات التي تنتج التهاب المفاصل هي عادة موجودة في التربة وبعض النباتات وخاصة الازهار وفي الطيور ولذلك فأن مربي الدواجن والمزارعين هم الاكثر اصابة بهذا النوع من الالتهاب (Goldenberg,١٩٩٨).

ب- خمج المفاصل الفيروسي (Viral arthritis)

ممكن ان تسبب الفيروسات التهاب مفاصل مايكروبياً مثل فيروس التهاب الكبد الفيروسي وفايروس النكاف وغيرها، ويظهر بعد اقل من اسبوع الى اسبوعين من الاصابة بالفيروس (Reveille,٢٠٠٠).

ج- خمج المفاصل البكتيري (Bacterial arthritis) وهو على ثلاثة انواع:-

١. خمج المفاصل البكتيري الحاد (Acute septic arthritis) **:** وهو اصابة بكتيرية في تجويف المفصل، وهو اخطر شكل من اشكال التهاب المفاصل، وهو مرض متعدد العوامل (Multifactorial) ويعتمد على التداخل بين الاستجابة المناعية للمضيف والممرض (Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢).

٢. خمج المفاصل البكتيري المزمن (Chronic bacterial arthritis) او التهاب المفاصل المتفاعل (Reactive arthritis)

وهو شكل من اشكال خمج المفاصل الذي يحدث كنتيجة للتفاعل مع اصابة بكتيرية حصلت في الجسم مثل اصابة العين او التهاب المجاري البولية او التهاب الامعاء او التهاب الجلد وتقرحات الفم وغيرها (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩).

٣. خمج المفاصل البكتيري الكامن

Latent bacterial arthritis (LBA) (or Low-grade infection)

هو خمج بكتيري يصيب المفاصل بدون اعراض سريرية واضحة وهو ينحسر او يتلاشى (يتم الحد من الاصابة به) بدون الحاجة الى مضادات حيوية، وهذه الاصابة تكون محدودة بالمفصل ولا تشمل بقية اعضاء الجسم ومنشأ الاصابة عن طريق الدم ويتداخل هذا النوع من الاصابة مع انواع اخرى من التهاب المفاصل مثل التهاب المفاصل الرثوي والتهاب المفاصل العظمي وخمج المفاصل المتفاعل وغيرها أي انه يشخص خطأ على انه احد الانواع الاخرى من خمج المفاصل لكن بعد التحليل البكتيري لسائل المفاصل (Synovial fluid biopsy) يتبين بأنه خمج مفاصل بكتيري كامن (Fassbender, ٢٠٠٤).

٢-٣: طرق او مصادر الاصابة (Routes or sources of infection)

في حالة التهاب المفاصل البكتيري الحاد يمكن ان تنتقل البكتريا من الدم عن طريق الاوعية في الغشاء المفصلي وهذا يعزى الى تجرثم الدم (Avinash & Abraham, ٢٠٠٤; Krijnen, ٢٠٠١). كما يمكن ان يحدث بسبب سحب سائل المفصل او حقن المفصل بعقار ستيرويدي بطريقة غير معقمة لكن هذه الحالة نادرة جداً، فضلاً عن امكانية حدوث الالتهاب بسبب حدوث صدمة سابقة للمفصل بوجود جرح او دون جرح او عضة حشرة، ويعد الدخول المباشر للبكتريا عن طريق التدخل الجراحي المصدر الرئيس للاصابة ولاسيما في الركبة. كما ان اصابة العظم ممكن ان تنتقل الى منطقة داخل المحفظة المفصلية واصابة المفصل خاصة في الاطفال (Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢).

اما بالنسبة لالتهاب المفاصل البكتيري المزمن او المتفاعل (Reactive or chronic bacterial arthritis)، فأنه يحدث نتيجة للاصابة ببعض الالتهابات البكتيرية في اجزاء مختلفة من الجسم مثل التهاب المجاري البولية والتهاب ملتحمة العين والالتهابات التناسلية والتهاب المعدة والامعاء ولذلك فأن مسببات هذا النوع من التهاب المفاصل هي نفس مسببات التهابات الاعضاء المذكورة (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩)، اذ انه ليس بالضرورة ان تكون البكتريا المسببة للمرض كاملة وانما يمكن ان تكون مستضدات البكتريا وخاصة HLA-B٢٧ antigens ان تسبب المرض، اذ يعتقد بأن التهاب المفاصل المتفاعل المزمن يحفز او يستحث بواسطة مستضدات مايكروبية تحمل الى المفصل بعد الاصابة في موقع مخاطي بعيد مثل الامعاء، القناة التنفسية والقناة البولية التناسلية (Salmi *et al.*, ١٩٩٧).

ويمكن ان يسبب الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) او الحامض النووي الرايبوزي (RNA) للبكتريا التهاب المفاصل البكتيري المتفاعل المزمن وبذلك يكون متوسطاً بالمستضدات البكتيرية المناعية الوراثية Immunogenetic bacterial antigens السالبة الزرع البكتيري الروتيني (Colmegna *et al.*, ٢٠٠٤). وهناك بكتريا معوية طبيعية في مرض التهاب المفاصل الرثوي ربما تكون متخفية لسبب وراثي او ذات جدار قادرة على حث مرض التهاب المفاصل البكتيري المتفاعل المزمن (Toivanen & Toivanen ١٩٩٩).

٢-٤: العوامل الممهدة لخمج المفاصل

(Predisposing factors for arthritis)

يعد مرض التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid arthritis) عامل خطر شائع يعرض المريض للاصابة بخمج المفاصل البكتيري، اذ ان مرضى التهاب المفاصل االرثوي تزداد لديهم الحساسية للاصابات البكتيرية وهذا يعزى الى نقص الانجذاب الكيمياوي (Chemotaxis) للعدلات (Neutrophils) وكذلك نقص في عمليات البلعمة، فضلاً عن تأثير العقارات الستيرويدية القشرية التي يتعاطاها مرضى التهاب المفاصل الرثوي والعلاجات الاخرى المضعفة للمناعة كما ان حدوث صدمة للمفصل (Trauma) تعد من عوامل الخطورة التي تعرض المفصل للاصابة (Zimmermann &

(Hojr, ٢٠٠٠; Mclnnes *et al.*, ١٩٩٨). واشار باحثون اخرون ان نسبة تعرض المصابين بداء المفاصل الرثوي للاصابة بالبكتريا المسببة لخمج المفاصل هي اكثر بـ ١٠ مرات مقارنة بالنسبة العامة، وكذلك عامل تقدم العمر هو ايضاً من العوامل الخطرة الممهدة للمرض، فضلاً عن عوامل اخرى مثل مرض السكر وسرطان الدم والسرطانات الاخرى ومرض نقص الكاماكلوبيولين والعلاجات داخل الوريد والامراض الكلوية والعلاجات الكيمياوية السامة للخلايا (Cytotoxic chemotherapy) ومرضى النقص المناعي مثل HIV تزيد من حدوث الاصابة بخمج المفاصل البكتيري (Krijnen *et al.*, ٢٠٠١; Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢)، ووجود المفاصل الاصطناعية تعد احد العوامل الممهدة للاصابات البكتيرية (Kaandorp *et al.*, ١٩٩٧; Frank *et al.*, ٢٠٠٤). ذكر باحثون اخرون أن ٧٥%
من مرضى التهاب المفاصل الرثوي معرضين للاصابة بخمج المفاصل البكتيري (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨ a). كما ان بعض حالات فقر الدم المنجلي (Sickle cell anaemia) بالامكان ان تكون عاملاً ممهداً للاصابة بخمج المفاصل البكتيري كما ان بعض حالات نزف الدم الوراثي (Haemophilia) وعمليات القثطرة تعد من العوامل الخطرة التي تعرض المريض للاصابة بخمج المفاصل وتعد الاصابات الاخرى في الجسم مثل خمج المجاري البولية والاخماج التنفسية والتناسلية والعيون والامعاء والمعدة من العوامل المحفزة للاصابة بخمج المفاصل البكتيري عن طريق بقايا البكتريا المسببة لهذه الاخماج اذ تمكنها من الوصول الى المفصل وتسبب ما يعرف بخمج المفاصل المزمن او التهاب المفاصل المتفاعل (Reactive arthritis) (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩). ويرى بعض الباحثين ان استعمار العنقوديات للبطانة الحرشفية الرطبة للانف (Nasal colonization) تعد احد العوامل الخطرة التي تعرض المريض للاصابة بخمج المفاصل (Roche *et al.*, ٢٠٠٣).

٢-٥: امراضية خمج المفاصل المايكروبي

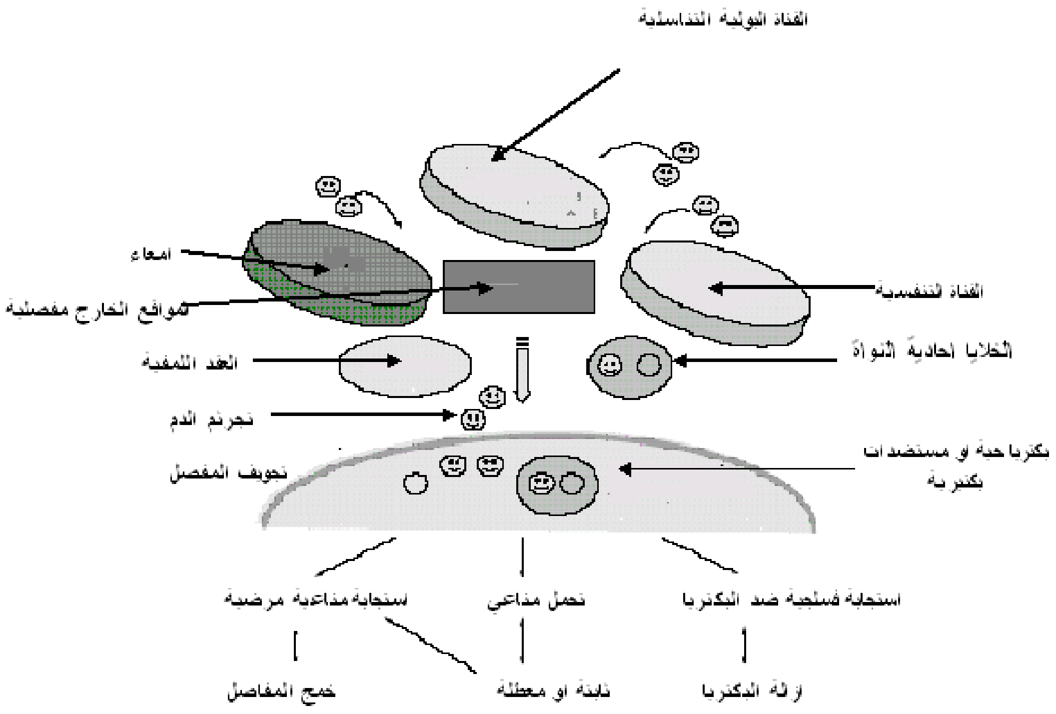
(Pathogenesis of microbial arthritis)

كما ورد سابقا هناك خمج مفصل حاد وهذا النوع امراضيته تعتمد بصورة مباشرة على الاصابة بالمسبب نفسه، اما بالنسبة للمزمن وهو يدخل ضمن اطار ما يعرف بالتهاب المفاصل المتفاعل (Reactive arthritis) وخمج المفاصل البكتيري الكامن، اذ ان الية المرض للمسبب في حالة خمج المفاصل المزمن تعتمد على النواتج البكتيرية او اجزاء منها مثل الببتيدات او المستضدات الفائقة (Superantigens) وهذا يختلف عن النوع الحاد، اذ يوجد في الالتهاب المزمن عدد من الميكانيكيات ومنها التشابه الجزيئي بين ببتيدات المايكروبات وببتيدات المضيف اذ تحث مرض مناعي ذاتي، والمستضدات الفائقة والمستضدات الذاتية وغيرها (Wucherpfenning, ٢٠٠١). هناك سؤال لابد ان يجاب عنه: هل البكتريا الحية مطلوبة دائماً لحث التهاب المفاصل المتفاعل او المزمن ؟ الجواب يبدو كلا اذ لوحظ ظهور اعراض المرض بعد حقن حيوانات مختبرية ببكتريا السالمونيلا المقتولة او ببروتين الكبد الفيروسي نمط B، في الحقيقة خمج المفاصل المستحث بالمستضد التجريبي يكون بتمنيع الحيوان اولاً وريدياً ثم بعد ذلك يختبر مناعياً بالمستضد نفسه عن طريق المفصل فيحدث التهاب المفاصل كتفاعل متوسط بالخلايا T والمعقد المناعي، بينما في التهاب المفاصل المتفاعل في الانسان يحدث

الالتهاب نتيجة اصابة سابقة للمريض خلال ذلك يصبح ممنعاً طبيعياً ضد المسبب المرضي، نفترض في هذه العملية ان المستضدات المايكروبية تنتقل الى الانسجة المفصلية عادة في اسبوع الى ثلاثة اسابيع هذا يحدث ربما خلال الخلايا البلعمية او الخلايا احادية النواة كمعقدات مناعية او حتى على شكل مستضدات حرة او اجسام بكتيرية متوالدة او متكاثرة، اذ تبين بأن التتابع في التفاعلات المناعية هو اولاً تفاعل متوسط بالـ CD_4 والخلايا T ثم التهاب مفاصل حاد، واخيراً الانسمام الخلوي المتوسط بالمعقد المناعي وهذا مشابه لما يحدث في خمج المفاصل المستحث بالمستضد التجريبي وهذه العملية سواء كانت واقعياً في مرضى البشر او تجريبياً في الحيوانات المختبرية تحتاج الى تجهيز مستمر بالمستضدات او على ازمان متباعدة، إذ يحدث في البشر عن طريق مستودعات مخفية او مختبئة مثل النسيج تحت المخاطي، وبهذا النوع من الاسباب (التفاعل المتوسط بالـ CD_4 والخلايا) المعتمد على التقديم المناعي (Immunological presentation)، ربما تكون العامل الرئيس المساهم في الامراضية المبكرة للشكلين المعتمد وغير المعتمد على HLA-B_{27} لالتهاب المفاصل المتفاعل المزمن. كما ان الية الانسمام الخلوي مع CD_8 تكون مطلوبة في استدامة وشدة خمج المفاصل المتفاعل المعتمد على HLA-B_{27} في الاشخاص الموجبين للـ B_{27}، لكن مع كل هذا تبقى الاسس الجزيئية لامراض خمج المفاصل المعتمد على B_{27} غير واضحة (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩). من الجدير بالذكر ان هناك ثلاث خصائص رئيسة لامراضية خمج المفاصل المتفاعل هو وجود البكتريا او النواتج البكتيرية في المفصل، التفاعل او التداخل بين البكتريا والمضيف واخيراً الاستجابة المناعية الموضعية ضد هذه البكتريا، في هذا النوع من خمج المفاصل من الصعوبة ودائماً ما تفشل طرق الزرع الروتينية في الحصول على اجسام بكتيرية في المفصل، لكن الدراسات الوراثية تبين وجود الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) وفي حالات اخرى الحامض النووي الرايبوزي (RNA) للبكتريا ممكن ان يسبب هذا النوع من خمج المفاصل، والدراسات المناعية تدل على وجود المستضدات البكتيرية المسببة لهذا النوع من الاصابة ومتعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharide ممكن ان يسبب هذا النوع من خمج المفاصل وفي هذه الحالة فأن مرضى خمج المفاصل المتفاعل يمتلكون استجابة للاميونوكلوبيولين المناعي نوع IgA تكون قوية ومدة المرض طويلة (Colmegna *et al.*, ٢٠٠٤).ان هذه البكتريا لها قدرة البقاء في تجويف المفصل والهروب من الجهاز المناعي اذ انها تقوم بأحد الادوار الآتية:-

١. دور التحوير المستضدي:- مثل انتاج بروتينات محورة مناعياً التي تشبه بروتينات الصدمة الحرارية، وقد استثمرت هذه الخاصية في خارج الحي كستراتيجية علاجية مستقبلية مثل هذه التحويرات تسمح للبكتريا بالهروب من الجهاز المناعي.
٢. دور التموضع الداخل خلوي: العديد من الاحياء المجهرية تهرب من الجهاز المناعي ببقائها في خلايا غير لمفاوية في داخل الخلايا المفصلية او خلايا اخرى مثل الخلايا البطانية Endothelial cells برغم استخدام المضادات الحيوية، بالنسبة للبكتريا المعوية يمكن ان تصيب بشكل مستمر الطبقة المخاطية للامعاء والعقد العصبية هناك، هذه المايكروبات توجد كذلك في الخلايا احادية النواة التي ربما تعمل كمستودع او غالباً كناقلات في المواقع خارج المفاصل الى داخل المفصل، هذه الحماية داخل الخلايا توفر لها هروباً من الجهاز المناعي.
٣. دور التشابه الجزيئي: بعض البكتريا تمتلك بروتينات شبيهة ببروتينات المضيف، هذا التشابه الجزيئي يعطيها منشأ للتحمل من المضيف وهذا يساعدها على الهروب من الجهاز المناعي، كما ان التشابه بين مكونات البكتريا ومستضد تجويف المفصل يمكن ان يحث ما يعرف بالتهاب المفاصل المناعي الذاتي.

٤. دور التداخل مع الخصائص المناعية الوراثية للمضيف. مثل السيطرة على انتاج السايتوكينات (التعدد الشكلي لجينات السايتوكين) التي لها دور في ازالة الالتهاب، فبغياب تفاعل السايتوكينات المناعي ضد المايكروب يسهل بقاء المايكروب في داخل الجسم، كذلك تستطيع بعض المايكروبات المسببة لخمج المفاصل ان تحور في بعض خطوات استنساخ mRNA وبالتالي تحوير ببتيدات المضيف، هذه التداخلات ربما تسهل بقاء البكتريا في الخلايا او الانسجة (Sibilia & Limbach, ٢٠٠٢; Wilkinson, ١٩٩٩). وهذه الادوار موضحة في شكل (٢-٢).



شكل (٢-٢): الية خمج المفاصل (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩).

٢-٦: البكتريا فاقدة الجدار Cell wall defective bacteria (CWDB)

٢-٦-١: خصائص البكتريا فاقدة الجدار:تظهر البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بأشكال مختلفة (Polymorphic shape) وتشبه الى حد ما المايكوبلازما متخذة اشكال متعددة، من ضمنها الكروي (Globular) والخيطي (Filamentous) والمستطيل (Oblong)، اذ ان التركيب الاساسي لهذه البكتريا هو الكروي والذي يتفاوت حجمه من ٠.٠٥ مايكرون (الاجسام الكروية الابتدائية Elementary bodies) الى ٥٠ مايكرون (يدعى بالاجسام الضخمة Large bodies)، وفي بعض الاحيان يصل حجمها الى حجم البكتريا التي نشأت منها، وتكون البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المعزولة من المرضى ذات شكل غير ثابت (Unstable) مكونة اشكال ذات تحولات عكسية (Reversible

(transitions) الـى الشـكل ذي الجـدار (Domingue & Woody, ١٩٩٧). اشــار الباحـث Waterhouse وجماعته (٢٠٠٤) الى انه هناك ادلة كثيرة حول المتطلبات الصعبة لتشخيص نوع من البكتريـا فـي امـراض المناعـة الذاتيـة (Autoimmune diseases) وهـذا النـوع مـن البكتريـا يسـمى بأشكال L او البكتريا فاقدة الجدار اومتعدد الاشكال (Pleomorphic) او مايكوبلازما وهي تميل لتكون صغيرة جداً وجدارها يميل ليكون ارق واكثر مرونـة من جدران الخلايا البكتيريـة النموذجيـة او ذات الجدار السميك، هذه البكتريا ربمـا تكون موجودة داخل خلايـا البلعم الكبير أوخلايـا اخرى وهي عـادة بطيئة النمو ومن الصعوبة دراستها وتنميتها في المختبر بالطرق الروتينية.

ان مسـتعمرات البكتريـا فاقدة الجـدار الخلـوي الناميـة علـى سطوح الاوسـاط الصـلبة ذات شـكل مظهـري شـبيه بـالبيض المقلـي (Fried egg colony) وبحجـوم مختلفـة وذات محـيط خـارجي شـبيه بالشريط الزيتـي (Lacyperiphery) يحيط بمركـز المسـتعمرة الـذي يكـون ذو لـون غـامق. ان الطـراز الخاص من النمو لمستعمرات فاقدة الجدار الخلوي (الشكل الشبيه بالبيض المقلي) هو ليس بسبب وجود الاكار وانما ينتج من خاصية لطبيعـة الكـائن المجهري (Indigenous property) والطريقـة التـي يتم فيها انقسام الخلايا (Domingue, ١٩٨٢).

كما ان البكتريا فاقدة الجدار تستطيع التكيف في الاوساط السائلة عند وضع قالب الاكار الحاوي على مستعمراتها وبسبب النزعة التي تمتلكها البكتريا فاقدة الجدار للبقاء علـى شكل تجمعـات او سلاسـل طويلة لذا ينصـح بـرج المـزارع بهدوء، وقد يحدث فقدان الجدار بسبب الاستخدام المفرط للمضـادات الحياتية التي تهاجم الجدار الخلوي مثل البنسلينات والسيفالوسبورينات، كذلك قد يحدث لاسباب مناعيـة تعود للمضيف، او اسباب وراثية تعود للممرض.

٢-٦-٢: البكتريا فاقدة الجدار والمناعة (CWDB & Immunity)

هنــاك ابحــاث تشـير الــى ان البكتريــا فاقـدة الجـدار (CWDB) او البكتريــا متعـددة الاشـكال (Pleomorphic) تحث استجابة الجهاز المناعي بشكل مفرط (Hyper-inflammatory immune system) ومن الواضح بأن هذه المايكروبات لا تحطم بواسطة الخلايـا البلعميـة (Phagocytes)، بـل تستطيع العيش في داخلها، وتمتاز هذه البكتريا ببطء نموها وصعوبة زرعها (Mangin, ٢٠٠٤).

وهناك ثلاث خصائص للبكتريا فاقدة الجدار وتأثيرها على الجهاز المناعي نوجزها بما ياتي:

١. البكتريا فاقدة الجدار صـغيرة جداً ولهـا القدرة علـى التخفي مـن الجهـاز المنـاعي بنموهـا داخـل الخلايا او بطرق اخرى.
٢. وجود هذه البكتريا يحفز خلايـا البلعم الكبير (Macrophage) لتحول الشكل غير الفعـال من فيتامين D الى الشكل الفعـال الـذي يحفز اعداد كبيرة من الخلايـا البلعميـة مسببة دورة التهابيـة شديدة تزيد السايتوكينات الالتهابية.
٣. هـذه البكتريـا تحفـز انتـاج الانجيوتنسـين (Angiotensin II) الـذي يسـهم ايضـاً فـي الالتهـاب (Waterhouse, ٢٠٠٤).

٢-٦-٣: البكتريا فاقدة الجدار وعلاقتها بخمج المفاصل (CWDB & arthritis)

هناك ادلة تجريبية وسريرية تدعم مفهوم البكتريا الخاملة التي من الصعب زرعها والتي تكون مطلوبة في كمون الاصابة وبقاء البكتريا والتي ربما تكون ممرضة، وهناك نظرية تفترض وجود دورة تكاثرية لهذا النوع من البكتريا الشاذة والتي تتواجد في انسجة مختلفة، هذه الكائنات يمكن ان تبقى في حالة ساكنة (كامنة) في المضيف ويمكن ان تسبب استجابات مرضية مصاحبة للمرض، وباستخدام تقنية PCR تم الكشف عن البكتريا العصوية المسببة لخمج المفاصل المتفاعل المزمن والذي يصطلح عليه احياناً (Whipples disease) التي لا يمكن الحصول عليها بطرق الزرع الشائعة الاستخدام (Domingue & Woody, ١٩٩٧).

وقد بين كامبسل وجماعته بأن هذه البكتريا (أي الفاقدة للجدار جزئياً) لها دور في تحفيز او حث حدوث التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid arthritis)، وقد تكون هذه البكتريا المحفزة حية او احماضها النووية هي المسببة لبداية امراضية هذا الخمج وخاصة في الحالات التي لا تتم السيطرة عليها في هذا المرض (Kempsell *et al.*, ٢٠٠٠). كما اشار لنفس ما ذكر باحثان اخران هما هايبر وبرنكلي (Huber & Brinkley, ١٩٧٧).

٢-٧: المسببات المشاركة في خمج المفاصل

١. العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*

وهي من اكثر مسببات خمج المفاصل شيوعاً (Nilsson *et al.*, ١٩٩٩; Avinash, ٢٠٠٤; Nair, ٢٠٠٠). وتتميز هذه البكتريا بظهور خلاياها بعد اجراء عملية التصبيغ على اشكال تشبه العناقيد موجبة لصبغة غرام، تنتج الانزيم المخثر لبلازما الدم (Coagulase)، تتراوح اشكال مستعمراتها على الاوساط الزرعية الصلبة بين دائرية الى بيضوية وبقطر ٠.٨-١ ملم، يختلف حجم هذه المستعمرات باختلاف السلالات، جميعها غير متحركة ولا تحمل اسواط وغير مكونة للسبورات وتتميز هذه البكتريا بلون اصفر ذهبي او ابيض عند نموها على الاوساط الزرعية وتحلل الجيلاتين وتتميز مستعمراتها بكونها شاحبة وموجبة للكاتليز (العاني والشبيب، ١٩٨٩). ولهذه البكتريا العديد من السموم والانزيمات التي تعد عوامل ضراوة لهذه البكتريا وهي:-

١. الانزيم المخثر لبلازما الدم Coagulase: والذي يؤدي وجوده الى حالة تجميع الفيبرينوجين الموجود ضمن التركيب الكيمياوي للبلازما (بمساعدة منشط موجود فيه) ومن ثم ترسيبه، ومن المميزات المهمة لهذا الانزيم تكوينه للاضداد اذ يمتلك صفة مستضدية وتثبيط عملية البلعمة (Nair *et al.*, ٢٠٠٠).
٢. بروتين A وهو مهم في مهاجمة الجهاز المناعي للمضيف وذلك بسبب ارتباطه في موقع FC الثابت للكلوبيولين المناعي IgG (Nair *et al.*, ٢٠٠٠).
٣. انزيم الفوسفاتيز الحامضي وهو يمثل اهمية تشخيصية.
٤. الانزيم المحلل للاحماض النووية.
٥. الانزيمات المعوية: وهي بروتينات لها القابلية على انتاج الاضداد لذا فأنها تعد مستضداً جيد الفعالية في انتاج الاضداد.
٦. الانزيمات المحللة لكريات الدم الحمر.

٧. الانزيمات المحللة لكريات الدم البيض (Leucocidin): يكمن تأثيرها على كل من الخلايا البلعمية والكريات الدموية البيضاء في منع تنفس هذه الخلايا نتيجة لزيادة نفاذيتها لايون البوتاسيوم يضاف الى ذلك تأثيرها على حركة الخلايا البلعمية، كما تؤدي الى تغيير شكلي وفسلجي لكريات الدم البيض وتسمى ايضاً هذه السموم بالـ Exofoliative toxin (العاني والشبيب، ١٩٨٩).

وهناك انزيمات تفرز من العنقوديات الذهبية وهي مهمة في اصابة العظم والمفصل وهي البروتينات المحللة للبروتين والدهون Proteases and Lipases ، اذ تعد محددات مهمة في غزو دفاعات المضيف و هناك نوع من الانزيم المحلل للبروتين V٨ proteases يشطر وينشط الكلوبيولين المناعي IgG في خارج الحي، وهي قادرة على تحطيم الببتيدات المضادة للمايكروبات المنتجة من خلايا المضيف، بعض سلالات العنقوديات الذهبية تحلل الدهون والاحماض الدهنية المنتجة من المضيف التي يمكن ان تهاجم البكتريا، فضلاً عن انزيم Hyalouronase المهم في تحطيم الهيالارونيت المفرز من الخلايا المفصلية (Nair *et al.*, ٢٠٠٠).

وقد اشار باحثون اخرون الى ان امراضية المكورات العنقودية الذهبية بسبب انتاج Staphylokinase الذي تستخدمه كالية تساعدها في غزو المضيف (Jin *et al.*, ٢٠٠٤). وتمتلك عامل ضراوة مسؤولاً عنه جين غريب هو Novel (MPrF) الذي يعتمد على تحوير دهون الغشاء لخلايا المضيف وتقتل الخلايا العدلة للمضيف (Peschel *et al.*, ٢٠٠١).

٢. المسبحيات القيحية (*Streptococcus pyogenes*)

وهي بكتريا كروية الشكل تتجمع خلاياها بشكل سلاسل او مسابح لذا سميت بهذا الاسم وهي موجبة لصبغة غرام وتنمو بشكل جيد على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات دقيقة الى متوسطة الحجم رصاصية اللون وهي تحلل كريات الدم الحمراء بشكل كامل (من نوعβ-haemolysis) ، سالبة لفحص الكاتليز ,(Brooks *et al.*, ١٩٩٨)وهي احد مسببات خمج المفاصل (Kaandorp *et al.*, ١٩٩٧) وتفرز هذه البكتريا العديد من الانزيمات وهي:-

١- محلل كريات الدم الحمراء المتأثر بالاوكسجين (Streptolysin O): ويعد ذا اهمية كبيرة في دراسة الاستجابة المناعية للشخص المصاب بالامراض المختلفة الناتجة عن هذه البكتريا.
٢- محلل كريات الدم الحمراء الثابت بالاوكسجين (Streptolysin S): وهو المسؤول عن التحلل الدموي الذي يلاحظ حول مستعمرات هذه البكتريا.

وهناك انزيمات اخرى مثل الستربتوكاينيز او محلل الفيبرين (Fibrinolysin) والانزيمات المحللة للاحماض النووية (Nucleases) وانزيم او عامل النفاذية (Hyaluronidase) يؤثر مباشرة على الطبقة الرابطة السمنتية الموجودة بين خلايا الجسم

ونتيجة لذلك يسهل دخول الخلية البكتيرية الى الجسم، واخيراً الانزيم المؤثر على كريات الدم البيض (Leucocidin) (العاني والشبيب، ١٩٨٩).

٣. النيسيرات البنية (*Neisseria gonorrhoeae*)

تعود هذه البكتريا الى العائلة (Neisseriaceae) وقد وصفت لاول مرة عام ١٩٧٩ من قبل Neisser ومن مميزات هذه البكتريا كونها طفيلية مجبرة، توجد في الجهاز البولي التناسلي للمرضى الذين يعانون من مرض السيلان ويكون شكل الخلايا بيضوي الى مكور وتتواجد بشكل ازواج تتقارب من الجهة المقعرة، ويختلف شكلها على الوسط الصلب المستعمل للتنمية حيث تكون في وسط المصل الصلب المستعمل مدورة ومقعرة وشفافة وناعمة ولماعة من الصفات الحيوية لهذه البكتريا قتلها بالحرارة الرطبة في ٥٥°م بأقل من خمس دقائق والرقم الهيدروجيني الامثل لها هو ٧.٥ والدرجة الحرارية المثلى لنموها ٣٧°م وتفشل في النمو على الوسط الخالي من المصل والدم ويفضل وجود ١٠% من ثاني اوكسيد الكاربون لتحسين النمو ولا يحدث نمو في الظروف غير الهوائية المجبرة (العاني والشبيب، ١٩٨٩). ويمكن ان تسبب هذه البكتريا التهاب المفاصل البني (Gonococcal arthritis) مرضى السيلان، حيث تبدأ بأصابة الخلايا الطلائية البولية غير المهدبة، ويعد وجود الاهداب في النيسيرات من اهم عوامل الضراوة لهذه البكتريا (Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢).

٤. اشريكيا القولون (*Escherichia coli*)

وهي عصيات قصيرة الى بيضوية سالبة لصبغة غرام والصفة التشخيصية لها هو البريق المعدني على وسط ايوسين المثيل الازرق، وذات مستعمرات وردية صغيرة على وسط ماكونكي الصلب وهي احد المسببات البكتيرية لخمج المفاصل اذ تعتبر اول العصيات السالبة لصبغة غرام في احداث التهاب المفاصل المايكروبي ولكن في حالة وجود امراض مرافقة او وجود عوامل ممهدة لمرض المفاصل فتكون ثاني العصيات السالبة لصبغة غرام بعد الزوائف (*Pseudomonas*) حسب ما اشار اليه كل من (Wilkinson *et al.*, ١٩٩٩; Shirtliff & Mader, ٢٠٠٠). بالاضافة الى ما اشار Mushtaq وجماعته(٢٠٠٤) الى دورها في خمج المفاصل.

٥. الكليبسلا الرئوية (*Klebsiella pneumoniae*)

وهي عصيات سالبة لصبغة غرام وذات مستعمرات وردية بمركز غامق وتتميز مستعمراتها باللزوجة بسبب وجود المحفظة (الكبسولة) وهي احد مسببات التهاب المفاصل المايكروبي (Kaandorp *et al.*, ١٩٩٧; Zou *et al.*, ٢٠٠٣).

٦. وتديات الخناق (*Corynebacterium diphtheriae*)

عصيات موجبة لصبغة غرام وغير متحركة لا تكون محفظة او سبورات تصطبغ بصبغة البرت فتظهر حبيبات الفوليوتين بلون اسود مزرق ويظهر بروتوبلازم العصيات بلون اخضر (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥) وتنمو البكتريا بشكل جيد في الاوساط الزرعية الحاوية على المصل او الدم مثل وسط Loifflers serum medium وهي احد مسببات خمج المفاصل (Goyal *et al.*, ٢٠٠٥).

٧. الزوائف الزنجارية (*Pseudomonas aeroginosa*)

عصيات متحركة سالبة لصبغة غرام غير مكونة للسبورات وهي احد مسببات خمج المفاصل حسب ما ذكره Kaandorp وجماعته (١٩٩٧). وتعد اول العصيات السالبة في احداث الخمج في حالة وجود امراض مرافقة (Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢).

٢-٨: المضادات الحياتية

٢-٨-١: المضادات الحياتية وعلاج خمج المفاصل

ان المضادات الحياتية المستخدمة في علاج خمج المفاصل المتأتي من الاحياء المجهرية الموجبة لصبغة غرام (التي تمثل الاحياء المجهرية الاكثر شيوعاً في احداث الاصابة) تكون ذات نفاذية جيدة في سائل المفاصل للمريض، اذ ان علاج خمج المفاصل البكتيري يتطلب اسبوعين الى ثلاثة اسابيع عبر الوريد او عبر الفم وان نفاذية المضاد في العظم او المفصل تختلف حسب عوامل معينة تعود للمضاد نفسه.

ولا بد من الاشارة الى صعوبة العلاج بالمضادات والحاجة الى فترة طويلة وغالباً ما تحتاج الى تدخل جراحي وان اختيار المضادات الحياتية يعتمد على عدة عوامل منها الكائنات المجهرية المعزولة من سائل المفصل ومدى حساسية العزول السريرية للمضادات الحياتية وعوامل الحركية الدوائية مثل نفاذيتها للعظم او المفصل ووجود مواد اصطناعية والتجهيز الوعائي للطرف المصاب وتحمل المريض للعقارات (Darley & MacGowan, ٢٠٠٤).

ان استخدام المضاد الحياتي بجرعة غير كافية يؤدي الى فشل العلاج وعدم ازالة الاصابة بشكل تام (Darley & MacGowan, ٢٠٠٤). ومن المشاكل التي ترافق استعمال المضادات الحياتية

(المثبطة وليست القاتلة للاحياء المجهرية) هي ان هذا المضاد يساعد على بقاء الكائن المجهري داخل الخلايا وعندما تسنح له الفرصة يستعيد نشاطه مع تكرار الاصابة (Gaston, ٢٠٠٠).

ويمكن ايجاز المضادات الحياتية الاكثر استخداماً في علاج خمج المفاصل:-

A- اللينكوسمايدات والبيتالاكتام (B-lactams & Lincosamides): اذ ان هناك ادلة تجريبية على عدم وجود مستويات واضحة من B-lactams في عظام الارانب بعد ساعتين من الحقن تحت الجلد، بينما بالعكس اللينكومايسين الذي ينتج بمستويات واضحة ضد اصابة العظم بالمكورات العنقودية الذهبية، والكلندامايسين والسيفالوسبورين عالي النفاذية في العظم وسائل المفصل ويكون بتراكيز منخفضة بالمصل.

B- الكوينولونات (Quinolons): مثل الاوفلوكساسين (Ofloxacin) وبفلوكساسين (Pefloxacin) درست بشكل واسع عن دورها في علاج التهاب العظم والمفصل ويقدم فعالية معينة ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام في خارج الحي، والكوينولون يمتلك فعالية ضد البكتريا التي لها قابلية التصاقية تخترق البلعم الكبير والخلايا متعددة الاشكال وتظهر تراكيز عالية في العظم والمفصل بعد تناولها عن طريق الفم وتمتلك تأثيراً جانبياً قليلاً، وتعد جيدة مقارنة بالعقارات القياسية وهناك معلومات عن وجود محاولات استخدام الكوينولونات في معالجة اصابة العظام والمفاصل التي تظهر نتائج مشجعة في دراسات تضمنت اصابات بالبكتريا الموجبة لصبغة غرام واحياء مجهرية متعددة اخرى.

ان السبروفلوكساسين فعال في التهاب العظم المزمن الذي يتسبب من مجموعة من الاحياء المجهرية كعلاج قياسي على الرغم من انه يستخدم غالباً في علاج المسببات المرضية الموجبة لصبغة غرام ويكون ذا تراكيز عالية بالمصل مقارنة مع العلاجات القياسية الاخرى.

وعندما تظهر مقاومة للكوينولون يستخدم الافلوكساسين (Ofloxacin) مع الريفامبسين (Rifampicin) اوحامض الفيوسيديك (Fusidic acid) مع الريفامبسين (Rifampicin) وهناك كوينولونات جديدة تعد ذات استخدام علاجي افضل من السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) مثل الموكسيفلوكساسين (Moxifloxacin) والليفوفلوكساسين (Leviofloxacin) وتمتلك مقاومة اقل من قبل الاحياء المجهرية الموجبة لصبغة غرام (Darley & Macgowan, ٢٠٠٤).

C- الريفامبسين وحامض الفيوسيديك Rifampicin & Fusidic acid: يعد تأثير الريفامبسين عندما يعطى مع مضادات حياتية اخرى مشجع جداً في المحاولات السريرية في الجسم الحي وخارج الجسم الحي ويعد عاملاً علاجياً جيداً ضد التصاق البكتريا المسببة لخمج المفاصل المقترن مع حالة وجود مفاصل اصطناعية والتهاب العظم المزمن، ويعد الريفامبسين (Rifampicin) ذا فعالية ممتازة ضد المكورات العنقودية لقتل البكتريا الملتهمة بواسطة البلعمة ويمكن ان يبيد الاحياء المجهرية الملتصقة (في طور الثبات) المسببة لالتهاب العظم، كما يضاف الريفامبسين الى النافسيلين (Nafcillin) للسيطرة على بقاء المكورات العنقودية المسببة لخمج المفاصل او العظام، لكن نقطة ضعف الريفامبسين النشوء السريع للمقاومة له من قبل الاحياء المجهرية لذلك لا بد ان يستخدم بالاشتراك مع مضادات اخرى (Darley & MacGowan, ٢٠٠٤)

ان حامض الفيوسيديك يشبه الريفامبسين من ناحية وصوله الى داخل الخلايا بتراكيز عالية ويمتلك فعالية جيدة تجاه المكورات العنقودية الذهبية المسببة لخمج المفاصل وكما في الريفامبسين فأنه تنشأ له مقاومة سريعة من قبل الاحياء المجهرية ولذلك لا بد من استخدامها مع نوع اخر من المضادات الحياتية.

٢-٨-٢: مضادات حياتية جديدة قد تستخدم في علاج خمج المفاصل

نظراً لظهور المقاومة من اغلب مسببات خمج المفاصل والعظام لذا ارتأى الاطباء وعلماء الاحياء المجهرية استخدام مضادات حياتية جديدة تؤثر في الاصابات العميقة ويمكن تحملها من قبل المرضى مثل Synercid وهو الاسم الملائم للـ Streptogrammin الذي يحتوي على quinupristin وdalfopristin وهو مضاد مثبط لتصنيع البروتين بالارتباط مع جزء الرايبوسوم ٥٠S الذي يستخدم ضد المكورات المعوية المقاومة للفلكوماسين وضد *Enterococcus faecium* والمكورات العنقودية الذهبية المتعددة المقاومة للمضادات. والمضاد الاخر هو (anoxozolidinone) Linezolid وهو يمثل صنفاً جديداً من المضادات بدون مقاومة مشتركة لمضادات اخرى، لكن هذه العلاجات مازالت تعد خطوات تمهيدية برغم النتائج المشجعة لها تجريبياً (Darley & MacGowan, ٢٠٠٤).

ولا بد من توافر خصائص معينة في المضادات الحياتية لكي يتم استعمالها في العلاج:-

١. قدرتها على تحطيم او تثبيط انواع كثيرة ومختلفة من المايكروبات الممرضة وهي ما تعرف بمضادات حياتية واسعة الطيف (Board spectrum antibiotics).
٢. يجب ان تمنع تطور المقاومة لدى المايكروب.
٣. يجب ان لا تحدث اعراض جانبية لدى المضيف مثل الحساسية وغيرها.
٤. يجب ان لا تحد من اعداد الفلورا الطبيعية في المضيف لان ذلك يؤدي الى اختلال التوازن الطبيعي حيث يساعد في نمو المايكروبات الانتهازية وجعلها ممرضة.

٢-٨-٣: عوامل المضيف التي تؤدي الى اختلاف تأثير المضادات الحياتية على المرضى:

١. قوة الجهاز المناعي للمرضى أو ضعفه.

٢. وجود انواع مختلفة من البكتريا في جسم المريض.

٣. وجود مشاكل صحية مصاحبة للمرض مثل الفشل الكلوي.

٤. اخذ عقارات مختلفة من قبل المريض.

٥. اصابات فطرية وفيروسية مصاحبة للخمج البكتيري (Mangin, ٢٠٠٤).

٢-٨-٤: عوامل الممرض التي تساعد على فشل فعل المضاد:-

١. الممرض البكتيري يصبح مقاوماً للمضاد الحيوي وراثياً او مظهرياً.

٢. البكتريا في طور نشط او خامل واشكال L-form اوالسيفيروبلاست (Spheroplasts) والبروتوبلاست (Protoplasts) هي المشكوك فيها ولكن نادراً ما تكون مجهزة للخمج المقاوم.

٣. الخمج قوي جداً (Gardner & Provine, ١٩٧٥).

٢-٩: النموذج التجريبي لخمج المفاصل

Experimental model of septic arthritis

من خلال الاطلاع على المصادر العلمية التي تخص خمج المفاصل التجريبي او المستحث تبين بأن الحيوانات المستعملة غالباً هي الفئران (Mice) اذ استعملت ذكور هذه الحيوانات في بعض التجارب التي قام بها بعض الباحثين (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨ a; Hultgren *et al.*, ١٩٩٨b). وفي بحوث اخرى استخدمت اناث الفئران في خمج المفاصل التجريبي كما في تجربة ساكوري وجماعته (Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣)، وفي دراسة اخرى استخدم كلا الجنسين (ذكور واناث هذه الفئران) كما ورد في Puliti وزملاءه (٢٠٠٢) وفي دراسة اخرى استخدمت ذكور الجرذان المختبرية (Rats) كموديل تجريبي لخمج المفاصل المستحث بالبكتريا (Campo *et al.*, ٢٠٠٣).

على الاغلب يتم حقن الحيوانات المختبرية عن طريق الوريد (Intravenous injection) ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية ذات الجدار Cell walled *Staphylococcus aureus* (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨a) وحقن حيوانات اخرى بالمكورات المسبحية القيحية ذات الجدار (Cell walled *Streptococcus pyogenes*) عن طريق الوريد ايضاً (Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣; Puliti *et al.*, ٢٠٠٢). واستخدم باحث اخر بكتريا *Eubacterium aerofaciens* وحقنها في جرذان مختبرية (Zhang, ٢٠٠١).

وقد تم تطبيق فرضيات كوخ في هذه الدراسات لعزل المسبب من الخمج العفوي ثم اعادة عزله من الخمج التجريبي .

Chapter Three الفصل الثالث

٣- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

٣-١: المواد

٣-١-١: الكواشف المستخدمة Reagents

حضرت حسب ما جاء في Macfaddin (٢٠٠٠) .

٣-١-١-١: كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

تم تحضير الكاشف قبل اجراء الفحص باذابة ١ غم من Tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydro-chloride في ١٠٠ مل ماء مقطر معقم.

٣-١-١-٢: كاشف كوفاكس Kovac's reagent

جرى تحضير الكاشف باذابة ١٠ غم من *p*-Dimethyl-aminobenzal dehyde في ١٥٠ مل كحول اثيلي وبعد ذلك اضيف حامض الهيدروكلوريك المركز (٥٠ مل) ببطئ. ويحفظ الكاشف في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ مْ.

٣-١-١-٣: كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

جرى تحضير الكاشف باذابة ٠.١ غم من احمر المثيل في ٣٠٠ مليلتر كحول اثيلي واكمل الحجم الى ٥٠٠ مليلتر باضافة ٢٠٠ مليلتر ماء مقطر.

٣-١-١-٤: كاشف الفانفثول وهيدروكسيد البوتاسيوم α-naphthol & KOH

أ- تحضير هيدروكسيد البوتاسيوم (٤٠%) باذابة ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء مقطر.

ب- تحضير الـ α-naphthol باذابة ٥ غم من α-naphthol في ١٠٠ مل كحول اثيلي مطلق.

٣-١-١-٥: محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (٣٪)

٣-١-٢: المحاليل المستخدمة Solutions

حضرت حسب ما جاء في Stukus (١٩٩٧) .

٣-١-٣-١: المحلول الملحي الفسيولوجي (Physiological Saline): حضر باذابة ٨.٥ غم من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر. أستخدم في غسل الخلايا البكتيرية في تقنية الزرع المتسلسل.

٣-١-٣-٢: المحلول الملحي الفورماليني (Formal Saline)٪١٠ : حضر باذابة ١٠ مل فورمالين (٤٠%) الى ٩٠ مل من ماء الملح الفسيولوجي. استخدم في حفظ مفصل الركبة المستأصلة من الحيوانات المحقونة بالعالق البكتيري.

٣-١-٣-٣: محاليل ماكفرلاند القياسية McFarland standards solutions: حضر من مزج ٩.٩مل من حامض الكبريتيك مع ٠.١ مل من كلوريد الباريوم استخدمت في مقارنة تركيز جرعة العالق الجرثومي الذي تم حقنه في الحيوان المختبري.

٣-١-٣: الصبغات Stains

٣-١-٣-١: صبغة غرام Gram's stain

حضرت هذه الصبغة كما ورد في Stukus (١٩٩٧). حيث تم اذابة ٢ غم من صبغة البنفسج البلوري في ٢٠ مل من الكحول الاثيلي (٩٥%)، واذيبت اوكزالات الامونيوم في الماء المقطر، مزج المحلولين سوية ورشح قبل الاستعمال.

اما الايودين فيحضر من اذابة ٢ غم من يوديد البوتاسيوم في ٣٠٠ مل من الماء المقطر، ثم اضيفت بلورات الايودين. اما السفرانين فيحضر من اذابة ٢.٥ غم في ١٠٠ مل من الكحول الاثيلي ثم اضيف الى ٩٠٠ مل ماء مقطر.

٣-١-٣-٢: صبغة دينز Diene's stain

حضرت هذه الصبغة مختبرياً كما ورد في Domingue (١٩٨٢)، تتألف الصبغة من المكونات الاتية:-

المثيل الازرق	٠.٥ غم
ازورAzure	١.٢٥ غم
مالتوز	١٠ غم

كاربونات الصوديوم	٠.٢٥ غم
حامض البنزويك	٠.٢٠ غم
ماء مقطر	١٠٠ مليلتر

تعقم الصبغة بالترشيح باستعمال مرشحات خاصة ذات ثقوب قياس ٠.٢٢ مايكرون قبل الاستعمال، استعملت هذه الصبغة في تصبيغ البكتريا فاقدة الجدار على الاوساط الصلبة.

٣-١-٣-٣: صبغة ليشمان Leishman's stain

حضرت هذه الصبغة حسب Cruickshank وجماعته (١٩٧٥) من اذابة ٠.١ غم من الصبغة في (٥٠) مل من الكحول الاثيلي المطلق، ثم رشحت ثلاث مرات بعدها تكون الصبغة جاهزة للاستخدام. استخدمت هذه الصبغة في دراسة الاستجابة المناعية الخلوية.

٣-١-٤-٤: صبغة البرت Albert's stain

حضرت هذه الصبغة حسب ما جاء في Cruickshank وجماعته (١٩٧٥)، اذ حضرت هذه الصبغة من المواد التالية:-

التوليدين الازرق(Toluidine blue)	١.٥ غم
الملكايت الاخضر(Malachite green)	٢ غم
حامض الخليك الثلجي(Glacial acetic acid)	١٠ مل
كحول(٩٥٪)	٢٠ مل
ماء مقطر	١٠٠٠ مل

ذوبت الصبغات في الكحول واضيفت الى الماء وحامض الخليك ثم تركت ثم رشحت. بينما الايودين حضر من:-

Iodine ٦ غم، يوديد البوتاسيوم ٩ غم، ماء مقطر ٩٠٠ مل. استخدمت صبغة البرت في تشخيص بكتريا الخناق.

٣-١-٤: الاوساط الزرعية Culture media

حضـرت حسـب مـا جـاء فـي تعليمـات الشـركة المنتجـة وMacfadding (٢٠٠٠) Domingue(١٩٨٢) والناصري (٢٠٠٢).

٣-١-٤-١: وسط الماكونكي الصلب (MacConkey's agar)

استعمل هذا الوسـط للتفريـق بـين البكتريـا المخمـرة للاكتـوز وغيـر المخمـرة، وكذلك باعتبـاره كوسط انتقائي للعائلة المعوية.

٣-١-٤-٢: وسط اكار الدم الصلب (Blood agar)

استعمل كوسط اغنائي لتنمية المسببات البكتيرية.

٣-١-٤-٣: وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Brain heart infusion broth)

استعمل هذا الوسط في تحضير وسط الفارنيت السائل والصلب.

٣-١-٤-٤: اكار المانيتول الملحي (Mannitol salt agar)

استعمل هذا الوسط لتنمية المكورات العنقودية الذهبية باعتباره وسطاً انتقائياً.

٣-١-٤-٥: اكار كلكر والحديد المائل (Kligler iron agar)

استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تخمر السكريات وانتاج غاز H_2S.

٣-١-٤-٦: وسط احمر المثيل- فوكس بروسكور (Methyl red-Voges proskaur)

استعمل هذا الوسط للكشف عن التحلل الكلي والجزئي لسكر اللوكوز.

٣-١-٤-٧: وسط ماء الببتون (Peptone water)

استعمل هذا الوسط للتحري عن انتاج الاندول.

٣-١-٤-٨: وسط سترات سيمون الصلب (Simmon's citrate agar)

استعمل هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون.

٣-١-٤-٩: وسط اليوريا الصلب (Urea agar)

استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز.

٣-١-٤-١٠: وسط ايوسين المثيل الازرق EMB (Eosin Methyl Blue agar)

استعمل هذا الوسـط لغـرض التمييـز بـين بكتريـا الاشـريكيا القولونيـة والكليبسـيلا حيـث تظهـر مستعمرات *E. coli* ذات لمعان معدني.

٣-١-٤-١١: وسط تخمر السكريات

استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير السكريات وانتاج الحامض والغاز منها.

٣-١-٤-١٢: وسط الفارينت السائل (Variant broth)

حضر هذا الوسط حسب ما جاء في Domingue (١٩٨٢)، باذابة ٣٧ غم من وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Oxiod) و١٠٠ غم من السكروز (Fluka) و٥ غم من خلاصة الخميرة Yeast extract (Mast) في ١٠٠٠ مل ماء مقطر. ثم ضبط الاس الهيدروجيني للوسط بين (٧.٤-٧.٦) ثم وزع في انابيب زجاجية بمعدل ١٠مل للانبوبة ثم عقم بالمؤصدة, استعمل لغرض تنمية البكتريا فاقدة الجدار.

٣-١-٤-١٣: وسط الفارينت الصلب (V.A) (Variant agar)

حضر هذا الوسط حسب ما جاء في Domingue (١٩٨٢)، باضافة ١٢ غم من الاكار (Biolife) الى نفس مكونات وسط الفارينت السائل وضبط الاس الهيدروجيني بين (٧.٤-٧.٦) وعقم بالمؤصدة ثم صب في الاطباق المعقمة، استعمل للحصول على مستعمرات البيض المقلي لفاقدة الجدار.

٣-١-٤-١٤: وسط ثنائي الطور (Biphasic media)

حضر هذا الوسط بصب ١٠ مل من وسط الفارينت الصلب في انابيب زجاجية ذات قاعدة مسطحة سعة ٢٥ مل محكمة السد وعقمت ثم وضعت بشكل مائل لحين انجماد الوسط ثم اضيف لكل انبوبة ٥ مل من وسط الفارينت السائل المعقم، استعمل لغرض تنمية البكتريا فاقدة الجدار (الناصري، ٢٠٠٢).

٣-١-٥:عدة التشخيص المصلي لبكتريا *Streptococcus pyogenes* نمط A

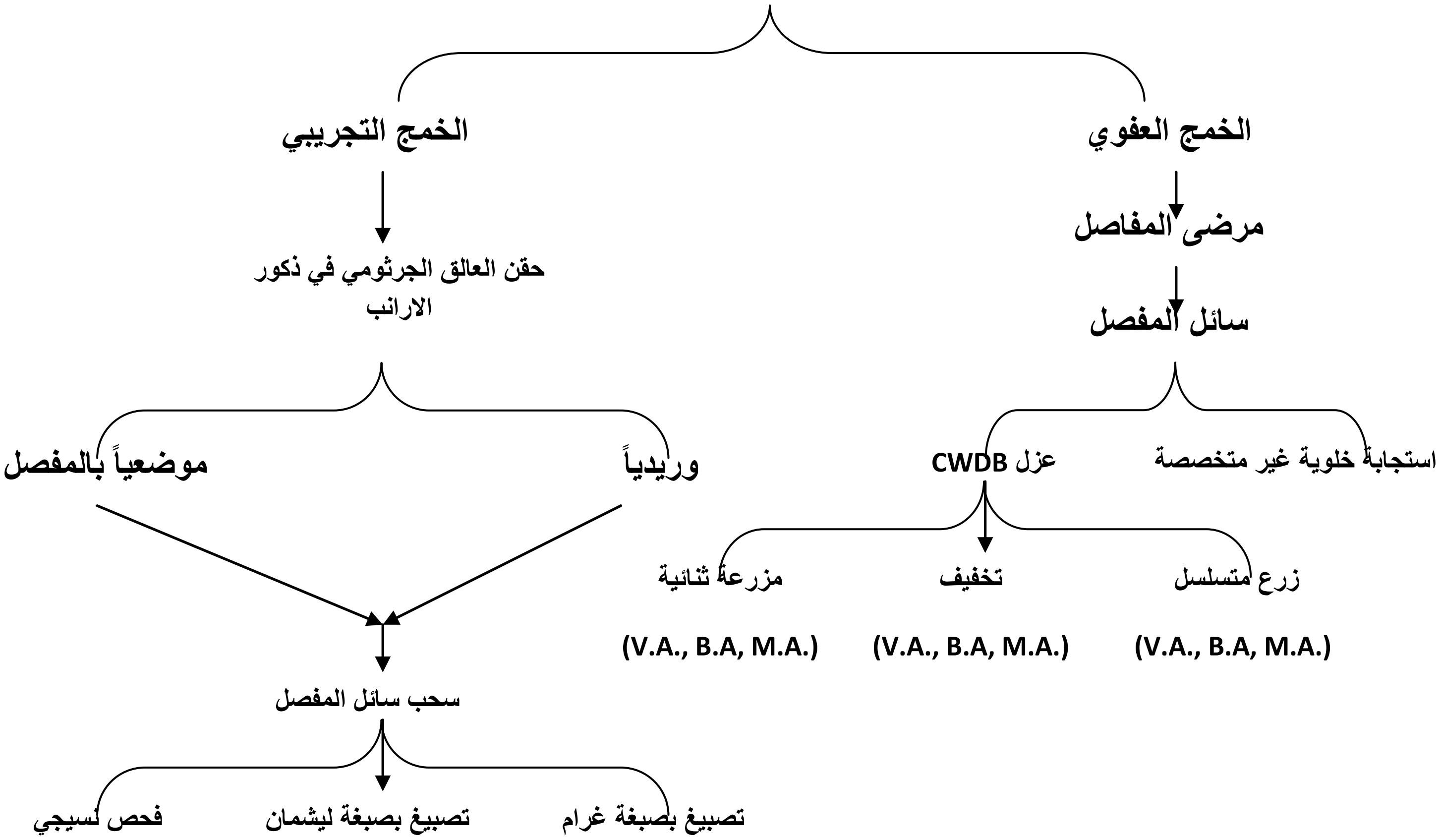
تتكون هذه العدة من انزيم الاستخلاص وعالق الـLatex، ومحلول السيطرة الموجبة والمجهزة من شركة Biomerieux ذات المنشا الفرنسي.

٣-٢: طرق العمل

٣-٢-١: جمع العينات Samples collection

جمعت ٣٠ عينة سائل مفصل الركبة لمرضى خمج المفاصل المزمن في المدة من كانون الاول ٢٠٠٤ لغاية ايلول ٢٠٠٥ وباعمار تتراوح بين ٢٠- أكثر من ٧٠ سنة من الذكور والاناث. اذ جمعت العينات من مستشفيات مرجان التخصصي والحلة التعليمي العام. وقد تم سحب السائل من مفصل الركبة المصابة من قبل اطباء اختصاص مفاصل وكسور اذ سحب ٥ مل من سائل المفصل وتحت ظروف معقمة ووضع في انبوبة بلاستيكية معقمة ذات الاستخدام لمرة واحدة (Disposable tube) ثم جرى نقلها الى مختبر الاحياء المجهرية المتقدم في قسم علوم الحياة/كلية العلوم لإجراء الدراسة عليها

٣-٢-٢: مخطط العمل البحثي



مخطط العمل البحثي

شكل (٣-١): مخطط العمل البحثي.

المختصرات:

V.A: Variant agar (وسط الفارينت)

B.A: Blood agar (وسط اكار الدم)

M.A: MacConkey agar (وسط اكار الماكونكي)

CWDB: Cell Wall defective bacteria (بكتريا فاقدة الجدار)

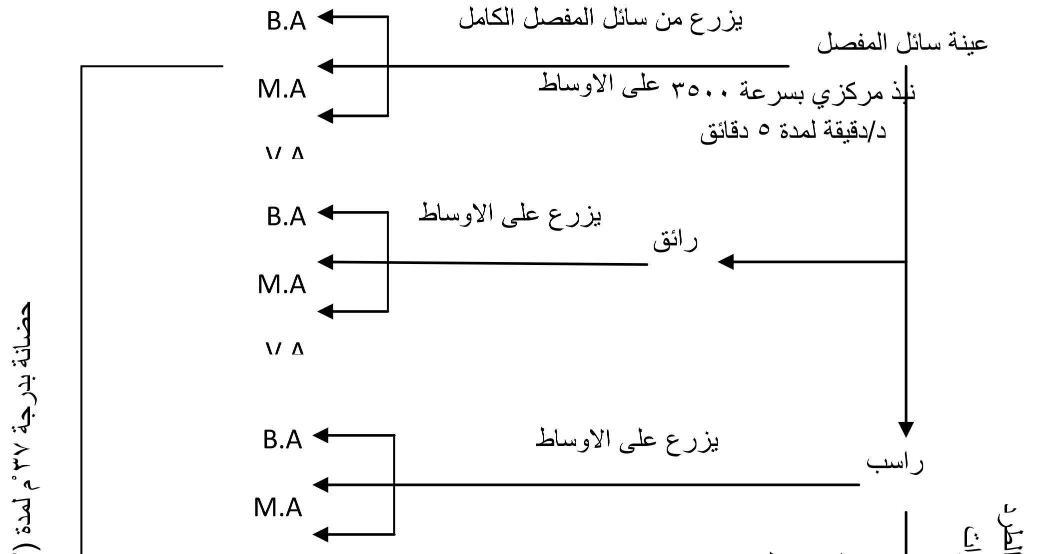
٣-٢-٢-١: التصبيغ بصبغة ليشمان

١. حضرت مسحة من راسب سائل المفصل على سطح شريحة زجاجية نظيفة.
٢. غمرت المسحة بصبغة ليشمان لمدة دقيقة واحدة.
٣. اضيف المحلول الدارئ بمقدار ضعف حجم الصبغة الموجودة على الشريحة.
٤. مزجت الصبغة جيداً عن طريق النفخ باستخدام ماصة باستور.
٥. تركت الصبغة على الشريحة مدة ٩ دقائق.
٦. تم غسلها بعد ذلك بالماء.
٧. نظفت الشريحة من الاسفل للتخلص من بقايا الصبغة.
٨. جففت بالهواء، فحصت تحت قوة X ١٠٠ للتحري عن كريات الدم البيض الموجودة في سائل المفصل التي تمثل الاستجابة الخلوية غير المتخصصة، اذ تم عد اكثر من ١٠٠ كرية دم بيضاء (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥).

٣-٢-٢-٢: زرع العينات

جرى زرع العينات للتحري عن المسببات المشاركة لخمج المفاصل المزمن بسبع طرق محورة وفق ما جاء في الناصري (٢٠٠٢) وهي:- زراعة سائل المفصل الكامل بالطريقة التقليدية، زراعة الرائق بعد النبذ، زراعة راسب سائل المفاصل غير المغسول، زراعة راسب سائل المفصل المغسول بماء الملح الوظيفي، زراعة الراسب المكسر بالماء المقطر المعقم مع النبذ، وزراعة رائق سائل المفصل المرشح المخفف واخيراً المزرعة ثنائية الطور. اذ تندرج هذه الطرق السبعة ضمن ثلاث تقنيات لزرع سائل المفصل: طريقة زرع سائل المفصل المتسلسل (رقم ١)، والراشح المخفف (رقم ٢)، والمزرعة ثنائية الطور (رقم ٣) كما موضحة في الشكل (٣-٢)، وتحتاج كل من هذه الطرق السبع اربعة انواع من الاوساط الزرعية وهي وسط اكار الماكونكي ووسط اكار الدم ووسط اكار الفارنيت ومرق الفارنيت، ويتطلب اكمال هذه التقنيات الزرعية حوالي ٥-٧ ايام للعينة الواحدة. ومن خلال هذه التقنيات بالامكان التحري عن موضع المسبب في واحد او اكثر من المواقع الآتية:-

١- المسبب منتشر في سائل المفصل الكامل.
٢- المسبب منتشر في رائق سائل المفصل.
٣- المسبب عالق على سطوح الخلايا القيحية او الدموية.
٤- المسبب متخفي داخل الخلايا القيحية او الدموية.



شكل (٣-٢) مخطط يوضح طريقة الزرع المتسلسل (تقنية I) والراشح المخفف (تقنية II) مع المزرعة ثنائية الطور تقنية (III).   المختصرات:

B.A: Blood Agar, M.A.: MacConkey agar V.A: Variant agar

D.W: Distilled water, N.S: Normal saline, BiM: Biphasic media

٣-٢-٣: التعرف والتشخيص (Diagnosis & Identification)

بعد الزرع وفق التقنيات الثلاثة لكل عينة من سائل المفاصل وحضانتها من ٣-٧ ايام، بعد ذلك تعد المزارع سالبة في حالة عدم وجود نمو، اما المزارع التي يظهر عليها نمو فيكون التعامل معها كما يلي :.

٣-٢-٣-١الوصف المظهري (Morphology)

تم تحضير مسحات مباشرة من مستعمرات نامية على اوساط مختلفة وتم تصبيغها بصبغة غرام ومعاينة شكل الخلية البكتيرية وترتيبها. اما المستعمرات النامية على وسط الفارينت الصلب فتم تصبيغها بصبغة دينز بتقنيتين هما تقنية غطاء الشريحة وتقنية قالب الاكار كما يلي:

٣-٢-٣-١-١: تقنية غطاء الشريحة (Cover slip Technique)

اذ تم اخذ غطاء شريحة زجاجي نظيف وضغط على المستعمرات النامية على وسط الـ Variant agar لكي تلتصق المستعمرة بالغطاء الزجاجي. ثم بعد ذلك نقل الغطاء بواسطة ملقط ووضع على سلايد زجاجي نظيف (Smear slide up)، وثبت الغطاء على الشريحة بوضع قطرات ماء عند الزوايا، وثبتت المسحة على الشريحة بوضع قطرات من كحول المثيل على غطاء الشريحة ثم جفف بالهواء، ثم اضيفت صبغة دينز وتركت لمدة ثلاث دقائق، ثم غسلت الشريحة بهدوء في حمام مائي بارد لمنع ازاحة غطاء الشريحة عن السلايد، جفف السلايد في الهواء وتم فحصه تحت المجهر (Domingue, ١٩٨٢).

٣-٢-٣-١-٢: تقنية قالب الاكار Agar block technique

اذ تم اخذ مقطع من وسط الاكار الحاوي على المستعمرات البكتيرية المطلوبة بواسطة شفرة حادة ومعقمة ووضع على سلايد نظيف وترك ليجف وتلتصق المستعمرات على السلايد ثم فحص السلايد تحت القوى الصغرى للتأكد من وجود المستعمرات المطلوبة، ثم بعد ذلك اضيفت قطرتين الى ثلاث قطرات من صبغة دينز الى قالب الاكار، تم غسلها حالاً بالماء البارد. بعد ذلك فحص السلايد مرة اخرى على القوة الصغرى في المواقع التي تم ملاحظتها قبل التصبيغ لملاحظة المستعمرات الفاقدة للجدار ثم تصويرها (Domingue, ١٩٨٢).

٣-٢-٣-٢: الوصف الزرعي (Cultural characteristics)

تم معاينة ودراسة الخصائص المظهرية للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية المختلفة وتحديد حجم المستعمرة وارتفاعها ولونها وحوافها ودراسة قوامها.

٣-٢-٣-٣: الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical Test)

٣-٢-٣-٣-١: فحص الاوكسديز (Oxidase Test)

تم الفحص بوضع بضعة قطرات من الكاشف على ورقة ترشيح نظيفة ثم نقل جزء صغير من المستعمرة النامية بواسطة عود خشبي نظيف (ذي استخدام واحد) وتم مزج المستعمرة على الورقة فعند ظهور اللون البنفسجي بعد عشر ثوان دليل النتيجة الموجبة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٢: اختبار الكاتليز (Catalase Test)

تم هذا الفحص بوضع قطرة من محلول كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز ٣% على شريحة نظيفة ثم تم اخذ كمية قليلة من المستعمرة وتم وضعها على الكاشف، اذ ان تكون الفقاعات أي تحرر الاوكسجين دليل على النتيجة الموجبة للفحص وان عدم تكون الفقاعات يعني النتيجة سالبة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٣: اختبار تحلل الدم (Blood Haemolysis Test)

لقح وسط الدم الصلب بالبكتريا المراد فحصها ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة ٣٧ ْم لمدة ٢٤ ساعة فعند ظهور مناطق خضراء حول المستعمرة يعني التحلل جزئي من نوع الفا، اما ظهور مناطق شفافة حول المستعمرة يعني التحلل كامل من نوع بيتا (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٤: اختبارانزيم تخثر بلازما الدم (Coagulase Test)

مزج بلازما دم الانسان مع مزروع بكتيري سائل في انبوبة زجاجية وحضن المزيج عند درجة حرارة ٣٧ ْم، كما مزج بلازما دم الانسان مع حجم

مماثل من وسط المرق المغذي وحضن بدرجة حرارة ٣٧°م كسيطرة. ففي النتيجة الموجبة تم تكون خثرة بعد ساعة الى اربع ساعات وعدم تكونها دليل على ان النتيجة سالبة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٥: اختبار النمو على وسط اكار المانتول الملحي

استعمل هذا الوسط للتمييز بين المكورات العنقودية الممرضة (المكورات العنقودية الذهبية) والمكورات العنقودية البيضاء، حيث ان البكتريا التي لها القدرة على تخمر سكر المانيتول وتغير لون الوسط الى الاصفر هي النتيجة الموجبة وهي تعني انها مكورات عنقودية ذهبية *S. aureus* (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٦: اختبار اليوريز (Urease Test)

تم تلقيح وسط اليوريا الصلب المائل بالبكتريا المراد فحصها، وتم حضنها عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، فأن تغير اللون الى الوردي يعني ان النتيجة موجبة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٧: التفاعل على اكار الكلكر والحديد (Kligler's Iron Agar Reaction)

تم اخذ المستعمرة النامية بواسطة ابرة ناقلة معقمة، اذ زرع الوسط المائل بالتخطيط وزرع القعر بالطعن وبعد ٢٤ ساعة تم قراءة النتائج من خلال تغير اللون من الاحمر الى الاصفر دليل الحامضية، وثباته على الاحمر دليل القاعدية، وتكون فقاعات تحت الوسط الصلب دليل على انتاج الغاز، وتكون اللون الاسود دليل على انتاج H_2S (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٨: فحص انتاج جذر الاندول (Indole Test)

لقحت الانابيب الحاوية على وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد تشخيصها وبعد مدة حضانة ٢٤ ساعة تم اضافة قطرات من كاشف كوفاكس، ان تكون الحلقة الحمراء بين الكاشف والوسط دليل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-٩: فحص استهلاك السترات (Citrate utilization Test)

لقحت الانابيب الحاوية على وسط Simman's citrate المائل بالبكتريا المراد اختبارها وبعد مدة حضانة من ١-٣ ايام عند درجة حرارة ٣٧°م، تم قراءة النتيجة اذ ان تحول اللون الاخضر الى الازرق هو النتيجة الموجبة وبقاءه اخضر هو نتيجة سالبة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-١٠: اختبار احمر المثيل (Methyl Red Test)

لقح وسط MR-VP السائل بالبكتريا المراد اختبارها وبعد مدة ٢٤ ساعة حضانة، اضيفت ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل. تكون اللون الاحمر دليل على ان النتيجة موجبة وتكون اللون الاصفر يعني ان النتيجة سالبة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٤-٣-١١: اختبار فوكس بروسكور (Voges-Proskauer Test)

لقح وسط MR-VP واختبر لانتاج استيل مثيل كاربينول (Acetyl methyl carbinol) بعد ٤٨ ساعة حضانة اضيفت ١٥ قطرة من الفانفثول ٥% و١٠ قطرات من ٤٠% هيدروكسيد البوتاسيوم الى ١ مل من المزروع. تطور اللون الاحمر في ١٥-٣٠ دقيقة يشير الى ان الاختبار موجب (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٣-١٢: فحص النمو على وسط ايوسين المثيل الازرق (EMB Test)

تم زرع البكتريا المراد اختبارها على وسط EMB agar، اذ ان ظهور البريق المعدني بعد مدة حضانة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م يدل على ان البكتريا هي الاشريكيا القولونية (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٤: التشخيص المصلي لبكتريا *S. pyogenes* نمط A

اجري الفحص المصلي باستخدام عدة التشخيص الخاصة للتحري عن بكتريا *S.pyogenes* حسب تعليمات الشركة المجهزة Biomerieux ذات المنشأ الفرنسي وكالاتي:-

أ- اخذ ملء الناقل من مزروع البكتريا النامي على وسط نقيع القلب والدماغ مع الدم بعمر ١٨ ساعة واضيف الى انبوب اختبار حاوي على ٠.٤ مل من انزيم الاستخلاص (Extraction enzyme) (المحضر باضافة ١٠ مل من الماء المقطر المعقم الى العبوة الحاوية على الانزيم المحضر) ومزج باستخدام المازج .

ب- حضنت الانبوبة عند درجة حرارة ٣٧°م في حمام مائي لمدة ١٥ دقيقة لاستخلاص المستضد الكاربوهيدراتي لجدار الخلية.

ج- وضعت قطرة من المستخلص على شريحة زجاجية ومزجت مع قطرة من عالق الـ Latex الحاوي على الاجسام المضادة الخاصة بالمجموعة المصلية A.

د- دورت الشريحة الزجاجية لمدة دقيقتين وسجلت النتيجة بالمقارنة مع محلول السيطرة الموجبة (Positive control)، حدوث التلازن خلال ٢-٣ دقائق دليل على ان النتيجة موجبة.

٣-٢-٣-٥: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity Test

٣-٢-٣-٥-١: اختبار حساسية البكتريا فاقدة الجدار للمضادات الحيوية

اجري اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية وفق ما جاء في Domingue (١٩٨٢)، اذ تم قطع الاكار الحاوي ٥-١٠ مستعمرات بكتيرية فاقدة الجدار على شكل قالب الاكار ونقل الى وسط مرق الفارنيت وحضن عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة ثم زرعت بواسطة مسحة قطنية على وسط الفارينت الصلب وخطط الطبق بثلاثة اتجاهات، ثم وزعت اقراص المضادات الحيوية على الوسط ثم حضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٣ ايام وحضن طبق سيطرة (عدم احتوائه على اقراص) فبعد انتهاء مدة الحضانة ظهور نمو بكتيري مجاور للقرص دليل على مقاومة البكتريا للمضاد وعدم ظهور النمو دليل على حساسيتها للمضاد الحيوي مقارنة بطبق السيطرة .

٣-٢-٣-٥-٢: اختبار حساسية البكتريا ذات الجدار للمضادات الحيوية

اجري اختبار حساسية البكتريا ذات الجدار وفق طريقة Kirby-Bauer (١٩٦٦) مع وجود بعض التحويرات اذ استعمل وسط الفارينت السائل بدل وسط المرق المغذي، واستعمل وسط الفارينت الصلب بدل وسط مولر هنتون الصلب، اذ تم نقل ٤-٥ مستعمرات الى وسط الفارينت السائل وحضن عند درجة حرارة ٣٧°م ولمدة ٥ ساعات ثم زرعت بواسطة مسحة قطنية على وسط الفارينت الصلب ثم ثبتت الاقراص وبعدها حضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة بعد انتهاء مدة الحضانة تم قياس قطر التثبيط بالمسطرة الاعتيادية.

جدول (٣-١): المضادات الحيوية المستخدمة واقطار تثبيطها ومديات مقاومتها (Benson, ١٩٩٨).

المضاد الحيوي	تركيز القرص	قطر منطقة التثبيط		
		المقاومة	المتوسطة	الحساسية
امبسلين (AMP)	١٠ µg	١٩>	٢٢-٢٧	>٢٩
كلوكساسلين (CX)	١ µg	١٤>	١٤-١٧	>١٨

سيفالوثين (CTX)	٣٠ µg	<١٢	١٥-١٧	>١٨
كلورامفينكول (C)	٣٠ µg	<١٢	١٣-١٧	>١٨
ارثرومايسين (E)	١٥ µg	<١٣	١٤-٢٢	>٢٣
ناليديكسيك اسد (NA)	٣٠ µg	<١٣	١٤-١٨	>١٩
تتراسايكلين (TE)	٣٠ µg	<١٤	١٥-١٧	>١٨
ستربتومايسين (S)	١٠ µg	<١١	-	>١٤
ريفامبسين (RF)	٥ µg	<١٦	-	>١٦
ترايميثوبريم ترايميثوبريم (SXT)	٢٥µg	<١٠	١٠-١٤	>١٦
بنسلين G	١٠ units	<٢٨	-	>٢٩

٣-٢-٤: التحليل الاحصائي

جرى دراسة جدوى الطرق المطوعة لدراسة البكتريا فاقدة الجدار من خلال استعمال اختبار Z كما ورد في فيركسوف (١٩٩١) وتم حساب قيمة Z من المعادلة الاتية:-

$$Z=\frac{P_1-P_2}{\sqrt{Pq\times(\frac{1}{N_1}+\frac{1}{N_2}}}$$

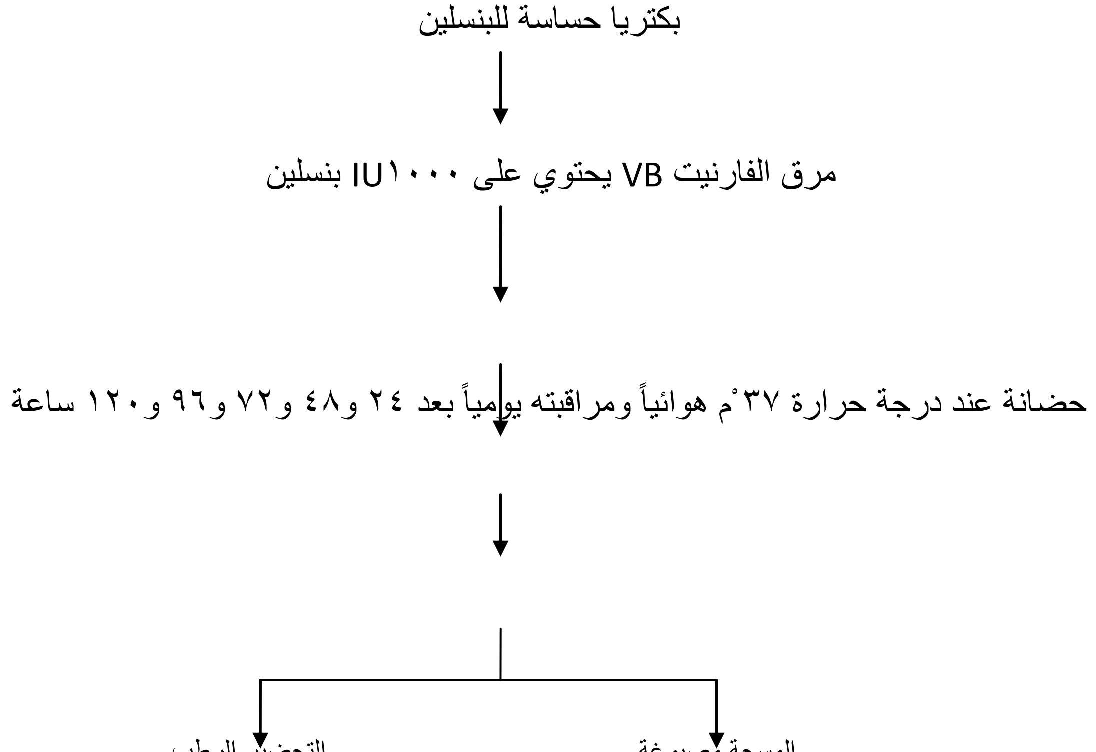
٣-٢-٥: نموذج تجريبي لخمج المفاصل في الارنب

٣-٢-٥-١: الحيوانات المختبرية

استعمل في هذه الدراسة ٢٠ ارنب من ذكور الارانب البيض النيوزلندية (*Oryctolagus cuniculus*) ذات اوزان تتراوح بين ١-١.٢٥ كغم، ادخلت الحيوانات الى البيت الحيواني-كلية العلوم-جامعة بابل. وعلمت الارانب باستخدام حامض البكريك ثم وضعت في اقفاص مخصصة بها. اذ تم تهيئة الظروف الملائمة (تهوية، اضاءة، علف حيواني، درجة حرارة (٢٠-٣٠ْم) ولمدة اسبوعين.

٣-٢-٥-٢: حث فقد الجدار بالبنسلين

استعمل البنسلين بتركيز ١٠٠٠ وحدة دولية في وسط الفارينت السائل (VB) اذ لقح هذا الوسط بالبكتريا المراد حثها على فقد الجدار مختبرياً. وجرى حضانتها عند درجة حرارة ٣٧ْم ثم تم متابعة النمو بعد ٢٤ ، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠ ساعة وذلك عن طريق الطرد المركزي بقوة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة للمزروع الجرثومي لمدة ٥ دقائق واخذ كمية قليلة من الراسب وعمل مسحة وصبغها بصبغة غرام لملاحظة التحول الى الاشكال فاقدة الجدار في كل مدة حضانة، وعند التأكد من حصول التحول الى الشكل الفاقد للجدار بنسب تقرب من ١٠٠% تم اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحياتية لهذه البكتريا الفاقدة للجدار وللبكتريا قبل المعاملة (Lawson, ١٩٨٢) كما في الشكل (٣-٣).



طرد مركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة مدة ٥ دقائق لكل مدة حضانة

فحص الراسب للتحري عن وجود الاجسام الدائرية باستعمال

شكل (٣-٣): حث فقد الجدار بالبنسلين.

٣-٢-٥-٣: تحضير العالق الجرثومي

٣-٢-٥-٣-١: تحضير العالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية واشريكيا القولون ذات الجدار:-

١. حضرت مزرعة نقية عمرها ٢٤ ساعة للبكتريا ذات الجدار على وسط الفارنيت الصلب.
٢. اضيف الى الطبق ٦ مل من محلول الملح الفسيولوجي physiological saline ٠.٨٥% وجرف النمو بواسطة عروة ناقلة معقمة.
٣. جمع المغسول بشكل عالق وتمت ممازجته بشكل جيد.
٤. اخذ ٥ مل من هذا العالق وطرد مركزياً بقوة ٤٠٠٠ د/دقيقة لمدة ٥ دقائق.
٥. اهمل الرائق وعلق الراسب بواسطة ٥ مل من محلول الملح الطبيعي وتم ممازجته تم طرد مركزياً بقوة ٣٥٠٠ د/دقيقة لمدة ٥ دقائق، وتكرر هذه العملية مرتين.
٦. تم مقارنة العالق الجرثومي مع انبوب ماكفرلاند ذو تركيز ٣×١٠^{٨} خلية/مل فاذا كان المحلول اكثر عتومة من انبوب ماكفرلاند خفف بمحلول الملح الطبيعي ان كان اكثر شفافية يركز بالطرد المركزي (Banker, ١٩٨٠; Svanborg-Eden *et al.*, ١٩٨٥).

٣-٢-٥-٣-٢: تحضير العالق الجرثومي للمكورات العنقودية واشريكيا القولون فاقدة الجدار:

١. حضرت مزرعة نقية عمرها ٥-٧ ايام للبكتريا فاقدة الجدار في وسط الفارينت السائل بعد حثها على فقد الجدار كما جاء في فقرة ٣-٢-٥-٢ حث فقد الجدار بالبنسلين.(Lawson ,١٩٨٢)

٢. مقارنة عتومة العالق الجرثومي مع انبوب ماكفرلاند ذو تركيز ^{٨}١٠×٣ بتخفيفه في حالة اذا كان العـــالق الجرثـــومي اكثـــر عتومـــة مـــن انبوبـــة ماكفرلانـــد وتركيـــزه بـــالطرد المركـــزي اذا كـــان العـــالق الجرثـــومي اكثـــر شـــفافية مـــن انبوبـــة ماكفرلانـــد.

٣-٢-٥-٤: حقن الحيوانات المختبرية

قسمت حيوانات التجربة الى مجموعتين رئيستين هما:- المجموعة الاولى تمثل مجموعة الحقن عبر الوريد (١٠ ارانب) والمجموعة الثانية تمثل مجموعة الحقن الموضعي بالمفصل (١٠ ارانب).

٣-٢-٥-٤-١: الحقن بالوريد Intravenous Injection

تضمن اجراء التجربة ٨ ارانب بواقع ارنبين لكل نوع من العالق الجرثومي، وهناك ارنبان تركا بدون حقن كسيطرة كما في جدول (٣-٢).

جدول (٣-٢): حقن الحيوانات المختبرية بالعالق الجرثومي في تجربة الحقن الوريدي.

نوع العالق الجرثومي	كميته وجرعته (خلية/مل)	عدد الحيوانات المحقونة
١- العالق الجرثومي للمكورات العنقودية فاقدة الجدار	٠.٨ مل من ^{٨}١٠×٣	٢
٢- العالق الجرثومي للمكورات العنقودية ذات الجدار	٠.٨ مل من ^{٨}١٠×٣	٢
٣- العالق الجرثومي لاشريكيا القولون فاقدة الجدار	٠.٨ مل من ^{٨}١٠×٣	٢
٤- العالق الجرثومي لاشريكيا القولون ذات الجدار	٠.٨ مل من ^{٨}١٠×٣	٢
٥- بدون حقن	لا يوجد	٢ سيطرة

٣-٢-٥-٤-٢: الحقن الموضعي بالمفصل Intra-articular injection

ان عدد الحيوانات ومدة التجربة هي نفس ما ذكر في الفقرة ٣-٢-٥-٤-١ لكن الاختلاف فقط في كمية الجرعة وموقع الحقن اذ ان كمية الجرعة هي ٠.١ مل من ^{٨}١٠×٣ خلية/مل وموقع الحقن هو مفصل الركبة. بعد الحقن جرى متابعة الارانب يومياً خلال مدة التجربة والتي استمرت ٢١ يوماً والتي

تم خلالها معاينة حيوانات التجربة من حيث الوزن والحركة والتغذية وظهور الاعراض السريرية، بعد انتهاء المدة تم القيام بالاجراءات الآتية:-

١. تم تصوير الارانب التي ظهرت عليها الاعراض المرضية مقارنة بحيوانات السيطرة.
٢. حقن ١.٠ مل محلول ملحي فسيولوجي معقم في منطقة مفصل الركبة ثم جرى سحب سائل مفصل الركبة، ووضع في انابيب معقمة ثم نقل للمختبر وعملت له شرائح وتم تصبيغها بصبغة غرام وصبغة ليشمان للاستدلال على وجود الخلايا والاستجابة المناعية الخلوية غير المتخصصة.
٣. تخدير حيوانات التجربة باستعمال طريقة التخدير عن طريق استنشاق مادة الايثر. ومن ثم تشريحها حسب القواعد المتبعة بالتشريح (لطفي والحاج، ١٩٨٤) لمعاينة ما يلي:-
   أ- المعاينة العامة.
   ب- معاينة الاعضاء الداخلية: المعدة، الامعاء، الكبد، الرئتين، الكلى.
   ج- مفصل الركبة وملاحظة الورم بعد ذلك جرى قطع مفصل الركبة باستخدام عدة التشريح ومن ثم وضعها في حامض النتريك بتركيز ١٠% لكي يصبح المفصل هشاً ثم ينقل الى محلول ملحي فورماليني بتركيز ١٠% لغرض اجراء التقطيع النسيجي (لطفي والحاج، ١٩٨٤).

٤- الدراسة النسيجية

حضرت المقاطع النسيجية في مختبر مستشفى الحلة التعليمي العام/قسم المقاطع النسيجية واتبعت طريقة بانكروفت وستيفنس(١٩٨٢) وذلك بوضع العينات في مثبت بوين (٢٤ ساعة) ثم غسلت النماذج عدة مرات بالكحول الاثيلي ٧٠% بهدف ازالة لون المثبت وحفظت العينات في كحول ٧٠% ثم اجريت الخطوات الآتية:-

أ- الأنكاز (Dehydration)

وضعت النماذج في تركيزات تصاعدية من الكحول الأثيلي ٧٠% ، ٨٠% ، ٩٠% ، ٩٥% و١٠٠% لمدة تتراوح بين ١-٢ ساعة وذلك لازالة الماء منها.

ب- الترويق (Clearing)

وضعت العينات بالزايلين من ١-١.٥ ساعة لكل مرة وذلك لازالة محلول الانكاز.

ج- التشريب (Infiltration)

شربت العينات بشمع البرافين المنصهر عند درجة حرارة ٥٦-٥٨° م . وذلك بوضع العينات فيه من ١-١.٥ ساعة لكل مرة.

د- الطمر (Embedding)

طمرت العينات في قوالب مخصصة بها حاوية على شمع البرافين المنصهر وتركت للتصلب.

هـ- التقطيع (Sectioning)

حضرت مقاطع نسيجية متسلسلة بسمك ٥ مايكروميتر باستعمال جهاز المشراح الدوار Rotary microtome وثبتت النماذج على شرائح زجاجية باستعمال لاصق البومين ماير (Mayer's albumin) وبعدها وضعت في الفرن في درجة حرارة ٥٦-٥٨ °م بوضع عمودي ولمدة ٢٠ دقيقة لازالة الشمع الزائد.

و- التصبيغ Staining

صبغت المقاطع النسيجية بصبغة Hematoxilin-Eosine اذ مررت الشرائح في زايلول-كحول اثيلي مطلق ١٠٠% ، ٩٥%، ٩٠% و٧٠% صبغة الهيماتوكسلين ولمدة دقيقتين لكل منها ثم غسلت المقاطع بماء الحنفية وغطست في صبغة الايوسين لمدة دقيقتين وغسلت بعدها بماء الحنفية ثم مررت بتراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي ٧٠%، ٩٠%، ٩٥% و ١٠٠% والزايلول لمدة دقيقتين.

ي- التحميل (Mounting)

وضع غطاء الشريحة باستعمال المادة اللاصقة كندا بلسم (Bancroft & Stevens, ١٩٨٢).

٥- تشخيص الشرائح النسجية (Examination of Histological Slides)

تم تشخيص المقاطع النسجية في كلية الطب-جامعة الكوفة.

الفصل الرابع Chapter Four

النتائج Results

٤-١:الخمج العفوي

٤-١-١: الفحص المباشر لمسحات رسابة سائل المفاصل المصبوغة بصبغة ليشمان :-

ظهر من فحص راسب سائل المفصل المصبوغ بصبغة ليشمان وجود خلايا بيض عدلة بنسبة ٦.٦٥%، وخلايا بيض احادية النواة بنسبة ٢٩.٩٥% وخلايا بيض لمفية بنسبة ٣.٣٥ %، وخلايا مختلطة بنسبة ١٣.٣٥٪كما في جدول ٤-١.

جدول (٤-١): مدى الاستجابة المناعية الخلوية غير المتخصصة في مرضى المفاصل (٣٠ عينة).

نوع كريات الدم البيض	العدد	النسبة المئوية
الخلايا اللمفية	١	٣.٣٥
الخلايا العدلة	٢	٦.٦٥
مختلطة	٤	١٣.٣٥
الخلايا وحيدة النواة	٩	٢٩.٩٥

٤-١-٢:الوصف المزرعي للمزارع الاولية

٤-١-٢-١:تقنيات زرع البكتريا فاقدة الجدار

جرى استعمال اوساط زرعية خاصة بعزل البكتريا فاقدة الجدار واوساط زرعية روتينية لعزل البكتريا ذات الجدار في ٣٠ عينة من سائل مفصل الركبة لمرضى خمج المفاصل المزمن للتحري عن المسببات المشاركة للخمج. اوضحت الدراسة الحالية ان نسبة الاصابة هي ٥٠% بالمسببات البكتيرية توزعت ما بين بكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار وكما موضح في جدول (٤-٢)، من خلال التحري عن المسببات المشاركة مع التهاب المفاصل المزمن تبين ان المسببات تتوزع على ست مجاميع، خمس منها مفسرة أي ان المسبب امكن التعرف عليه وواحدة غير مفسرة أي لم يكن بالامكان عزله والتعرف عليه باستعمال تقنيات الزرع المحورة في هذه الدراسة اذ شمل التحري استعمال تقنية الزرع المتسلسل وتقنية التخفيف والمزرعة ثنائية الطور للمجموعات(١- ٦)، اذ تضمنت المجموعة (١)عينتين وهي موجبة في جميع التقنيات، المجموعة (٢)تضمنت اربع عينات وهي سالبة الزرع في المراحل الثلاث

الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات، المجموعة (٣) تضمنت ثلاث تقنيات وهي موجبة الزرع في تقنية الزرع المتسلسل وسالبة في التخفيف والمزرعة ثنائية الطور، المجموعة (٤) وهي موجبة في تقنية الزرع المتسلسل (ما عدا الخطوة الاولى) والمزرعة ثنائية الطور وسالبة في التخفيف المجموعة(٥) وهي سالبة فقط في المرحلتين الاوليتين من الزرع المتسلسل وموجبة لبقية التقنيات وتضمنت ثلاث عينات، المجموعة (٦) وتضمنت ١٥ عينة وهي سالبة في جميع التقنيات (غير المفسرة) كما في الجداول (٤-٣، ٤-٤، ٤-٥، ٤-٦، ٤-٧ و٤-٨).

جدول (٤-٢): نسبة الاصابة بالمسببات البكتيرية في ٣٠ عينة من مرضى خمج المفاصل المزمن.

طبيعة البكتريا	العدد	النسبة المئوية %
بكتريا فاقدة الجدار	٧	%٢٣.٣٠
بكتريا مشتركة (ذات جدار وفاقدة للجدار)	٦	%٢٠.٠٥
بكتريا ذات جدار	٢	%٦.٦٥
نتائج سالبة الزرع	١٥	%٥٠
العدد الكلي	٣٠	%١٠٠

جدول (٤-٣): المجموعة (١) وهي موجبة الزرع في جميع التقنيات (عينتين):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٢	٠	٢	٠	٢	٠
رائق النبذ	٢	٠	٢	٠	٢	٠
راسب النبذ	٢	٠	٢	٠	٢	٠
الراسب المغسول	٢	٠	٢	٠	٢	٠
الراسب المكسر	٢	٠	٢	٠	٢	٠

ب- تقنية التخفيف:-

التخافيف		اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١:١٠	٢	٠	٢	٠	٢	٠
	١:١٠٠	٢	٠	٢	٠	٢	٠
	١:٥٠٠	٢	٠	٢	٠	٢	٠

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٢	٠	٢	٠	٢	٠

جدول (٤-٤): المجموعة (٢) وهي سالبة الزرع في المراحل الاربع الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لبقية التقنيات (٤ عينات):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٠	٤	٠	٤	٠	٤
رائق النبذ	٠	٤	٠	٤	٠	٤
راسب النبذ	٠	٤	٠	٤	٠	٤
الراسب المغسول	٠	٤	٠	٤	٠	٤
الراسب المكسر	٤	٠	١	٣	٤	٠

ب- تقنية التخفيف:-

التخافيف		اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١:١٠	٣	١	١	٣	٤	٠
	١:١٠٠	٤	٠	٠	٣	٤	٠
	١:٥٠٠	٤	٠	٠	٤	٤	٠

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٤	٠	٢	٢	٤	٠

جدول (٤-٥): المجموعة (٣) وهي سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة في تقنيات التخفيف والمزرعة ثنائية الطور (٣ عينات):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٠	٣	٠	٣	٠	٣
رائق النبذ	٠	٣	٠	٣	٠	٣
راسب النبذ	٠	٣	٠	٣	٠	٣
الراسب المغسول	٠	٣	٠	٣	٠	٣
الراسب المكسر	٠	٣	٠	٣	٠	٣

ب- تقنية التخافيف:-

التخافيف		اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١:١٠	٣	٠	٣	٠	٣	٠
	١:١٠٠	٣	٠	٢	١	٢	١
	١:٥٠٠	٣	٠	١	٢	٣	٠

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	اكار الدم	اكار الماكونكي	اكار الفارنيت

	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٣	٠	٣	٠	٣	٠

جدول (٤-٦): المجموعة (٤) وهي موجبة الزرع في تقنية الزرع المتسلسل ما عدا الخطوة الاولى والمزرعة ثنائية الطور وسالبة في تقنيات التخفيف (٣ عينات):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٠	٣	٠	٣	٠	٣
رائق النبذ	٢	١	٠	٣	٢	١
راسب النبذ	٣	٠	١	٢	٣	٠
الراسب المغسول	٣	٠	١	٢	٣	٠
الراسب المكسر	٣	٠	٣	٠	٣	٠

ب- تقنية التخافيف:-

التخافيف		اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١٠:١	٠	٣	١	٢	٠	٣
	١٠٠:١	٠	٣	٠	٣	٠	٣
	٥٠٠:١	٠	٣	٠	٣	٠	٣

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٣	٠	٣	٠	٣	٠

جدول (٤-٧): المجموعة (٥) وهي سالبة الزرع في المرحلتين الاوليتين من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لبقية التقنيات (٣ عينات):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٠	٣	٠	٣	٠	٣
رائق النبذ	٠	٣	٠	٣	٠	٣
راسب النبذ	٣	٠	١	٢	٢	١
الراسب المغسول	٣	٠	٠	٣	٣	٠
الراسب المكسر	٣	٠	١	٢	٣	٠

ب- تقنية التخافيف:-

التخافيف		اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١:١٠	١	٢	٠	٣	١	٢
	١:١٠٠	٢	١	١	٢	١	٢

	١:٥٠٠	١	٢	١	٢	١	٢

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٣	٠	٠	٣	٣	٠

جدول (٤-٨): المجموعة (٦) وهي سالبة الزرع في التقنيات كلها (١٥ عينة):-

أ- تقنية الزرع المتسلسل:

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارنيت	
	+	-	+	-	+	-
سائل المفاصل الكامل	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
رائق النبذ	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
راسب النبذ	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
الراسب المغسول	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
الراسب المكسر	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥

ب- تقنية التخافيف:-

التخافيف	اكار الدم	اكار الماكونكي	اكار الفارنيت

		+	-	+	-	+	-
رائق الخلايا المكسر	١٠:١	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
	١٠٠:١	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥
	٥٠٠:١	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥

ج- تقنية المزرعة ثنائية الطور:-

العينة	**اكار الدم**		**اكار الماكونكي**		**اكار الفارنيت**	
	+	-	+	-	+	-
راسب الخلايا المكسرة	٠	١٥	٠	١٥	٠	١٥

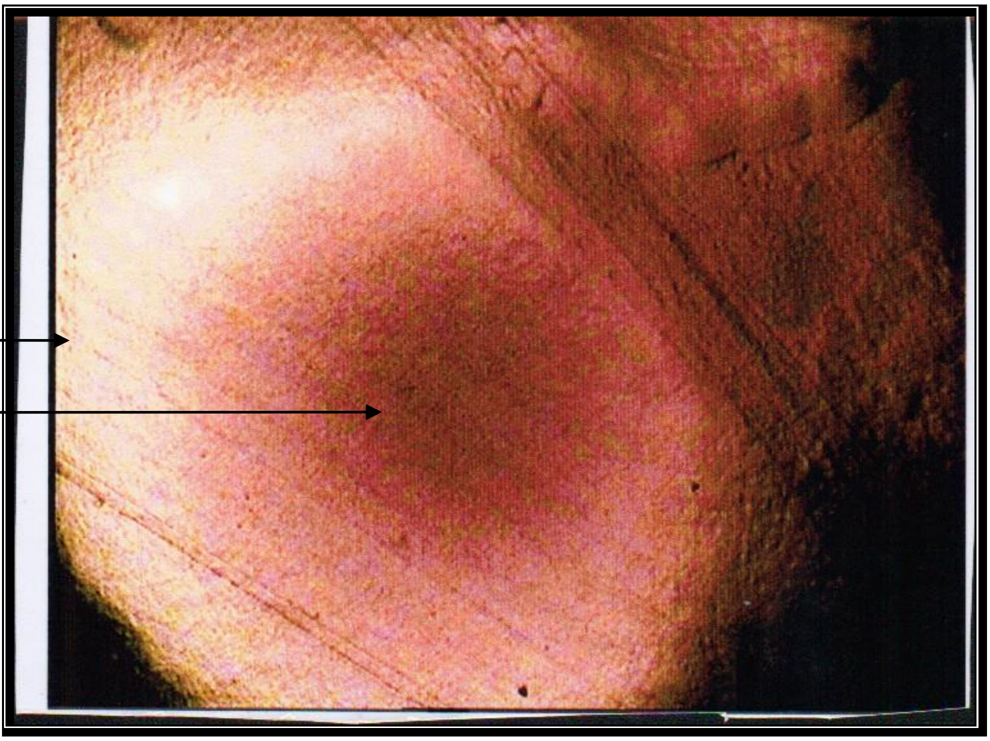
٤-١-٢-٢: الوصف المزرعي للبكتريا فاقدة الجدار:-

اظهرت الدراسة الحالية ان الوصف المزرعي للبكتريا فاقدة الجدار التي تم عزلها من مرضى خمج المفاصل بانها ذات مستعمرات دقيقة شبه شفافة بعضها براقة عند سقوط الاشعة المائلة عليها ,واظهرت صبغة دينز مظهر البيض المقلي لمستعمرات هذه البكتريا الفاقدة للجدار كما في الشكل (٤-١),اما الوصف المجهري لهذه الكائنات كان بشكل تجمعات خلوية متلاحمة بسبب فقدها للجدار الخلوي و ذات اشكال دائرية او بيضوية منتفخة,اما بالنسبة للخصائص الفيزياوية فقد كانت هذه البكتريا ذات طبيعة مرنة قابلة للانضغاط و تترشح من خلال المرشحات الدقيقة اما بالنسبة للخصائص الكيموحيوية فكانت مضاهية لذات الجدار الا انها قد تكون ابطا في ظهور النتيجة كما في جدول (٤-٩).

جدول (٤-٩): خواص البكتريا فاقدة الجدار.

ت	الظاهرة	خواص فاقدة الجدار

١	الوصف المزرعي	تكون نمط واطئ العتمة، شبه شفاف مع رسابة ناعمة في الوسط السائل، اما في الوسط الصلب تكون المستعمرات دقيقة، شفافة او شبه شفافة، بعضها براق عند سقوط الاشعة المائلة، اظهرت مظهر شبيه بالبيض المقلي، تصطبغ المستعمرات بشكل واضح وتتبين صفاتها واضحة.
٢	الوصف المجهري	تجمعات مندمجة نظراً لفقدها للجدار الخلوي، اشكال دائرية او بيضوية منتفخة.
٣	الوصف الفيزياوي	مرنة وقابلة للانضغاط وتترشح خلال المرشحات الدقيقة، ممكنة الارتداد ولكنها قد تكون قابلة للثبات.
٤	الوصف الكيموحيوي	ان نتائج الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا فاقدة الجدار كانت مضاهية للبكتريا ذات الجدار، لكنها اظهرت بطيء في ظهور النتيجة او اقل وضوحاً واحياناً تفقد البكتريا فاقدة الجدار بعض الانزيمات وبالنسبة للفحوص الكيموحيوية في الوسط السائل تزرع عن طريق قالب الاكار الحاوي على النمو.



الشكل (٤-١): شكل المستعمرات لبكتريا اشريكيا القولون فاقدة الجدار غير المصبوغة على قوة تكبير X٤.

٤-١-٢-٣: جدوى استخدام تقنيات الزرع المحورة لزرع سائل المفصل

من خلال دراسة ٣٠ عينة سائل المفصل لمرضى خمج المفاصل المزمن وتطبيق التقنيات المختلفة تبين ان زرع الراسب المكسر والمزرعة ثنائية الطور كانت ذات نتائج ايجابية عالية مقارنة بالطرق الاخرى. كما اظهرت ذلك النسب المئوية والنتائج الاحصائية لاختبار Z الموضحان في جدول (٤-١٠) و(٤-١١).

جدول (٤-١٠): استخدام تقنيات محورة لزرع سائل المفصل لـ (٣٠ عينة).

ت	التقنية	الموجب: (%)
١	سائل المفصل كله (منهجية رقم ١)	٢: (٦.٦)
	رائق النبذ (منهجية رقم ٢)	٥: (١٦.٦)
	راسب النبذ (منهجية رقم ٣)	٧: (٢٣.٣)

	الراسب المغسول (منهجية رقم ٤)	٨ : (٢٦.٦)
	الراسب المكسر (منهجية رقم ٥)	١٢ : (٤٠)
٢	الراشح المخفف (تقنية رقم ٢)	١٠: (٣٣.٣)
٣	المزرعة ثنائية الطور (تقنية رقم ٣)	١٥: (٥٠)

جدول (٤-١١): استخدام طرائق الزرع المختلفة بالمقارنة مع زرع سائل المفصل كله بتطبيق اختبار Z.

الخصائص الإحصائية Statistical features	Types of culture methods (أنواع تقنيات الزرع)					
	ثنائية الطور مع سائل المفصل كله	الراشح المخفف مع سائل المفصل كله	الراسب المكسر مع سائل المفصل كله	الراسب المغسول مع سائل المفصل كله	راسب النبذ مع سائل المفصل كله	مقارنة راسب النبذ مع سائل المفصل كله
P_1	٠.٥٠	٠.٣٣	٠.٤٠	٠.٢٦	٠.٢٣	٠.١٦
P_2	٠.٠٦	٠.٠٦	٠.٠٦	٠.٠٦	٠.٠٦	٠.٠٦
P	٠.٥٦	٠.٤٠	٠.٤٦	٠.٣٣	٠.٣٠	٠.٢٣
q	٠.٤٤	٠.٦٠	٠.٥٤	٠.٦٧	٠.٧٠	٠.٧٧
Z_c	٣.٥٠	٢.١٠	٢.٧٠	١.٨٠	١.٤٠	١.٠٠
Z_t	٠.٩٩٩٧	٠.٩٨٢٦	٠.٩٩٦٦	٠.٩٦٤٩	٠.٩٢٠٧	٠.٨٤٣٨
P_L	٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١

حيث P_1 يمثل احتمالية أي من التقنيات المطوعة في هذه الدراسة، P_2 احتمالية التقنية الروتينية (زرع سائل المفصل كله)، **P** هي حاصل جمع احتمالية أي من التقنيات مع الطريقة الروتينية، **q**: الفرق بين احتمالية أي من التقنيات مع الطريقة الروتينية، Z_c تمثل قيمةz المحسوبة، Z_t تمثل قيمة Z الجدولية، P_L تمثل مستوى الاحتمالية

٤-١-٣ :الوصف المزرعي للمزارع الثانوية

اظهرت الدراسة الحالية للمزارع الثانوية للعزلات البكترية التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة بأنها ذات اشكال مختلفة بعض منها كانت ذات صفات مشابهه للبكتريا المعزولة من المزارع الاولية من ناحية صفات المستعمرة و الوصف المجهري وهذه الحالة تدعى بالثبوتية(Commitment),بينما اظهرت عزلات اخرى صفات مشتركة بين البكتريا فاقدة الجدار و ذات الجدار من ناحية صفات

المستعمرة والوصف المجهري بفقدها الجدار جزئيا وهو ما يسمى بالمرحلة الانتقالية(Transitional state) بينما كانت اغلب العزول البكتيرية قد رجعت الى الشكل ذي الجدار مزرعيا ومجهريا بعد الزرع الثانوي بسبب قدرتها على اعادة تكوين الجدار بعد توافر الظروف الملائمة لها وهو مايعرف بالارتداد(Reversion) اما بالنسبة للخواص الكيمياوية فكانت صفاتها مشابهة للعزلات الاصلية في المزارع الاولية.

٤-١-٤: دورة حياة البكتريا فاقدة الجدار في خمج المفاصل المزمن.

من خلال ما تم ملاحظته من النتائج الزرعية والمجهرية التي تم الحصول عليها باستخدام تقنيات محورة لعزل البكتريا فاقدة الجدار من سائل المفصل يحتمل وجود وحدات بدائية بأمكانها التوالد Elementary reproductive units (ERUs)، وهذه الوحدات قد تكون حرة خارج الخلايا او ملتصقة على جدران الخلايا اللمفاوية والقيحية، او في داخل هذه الخلايا فعندما تكون خارج الخلايا وعند توفر الظروف الملائمة فأنها تتمكن من النمو في المراحل الاولى من الزرع المتسلسل، اما عندما تكون هذه الوحدات ملتصقة على جدران الخلايا او في داخل الخلايا فأنها تتحرر خلال مرحلة التكسير بعد غسل الراسب بالماء المقطر اذ انها تمر خلال المرشحات الفائقة (٠.٢٢ µm) عند ترشيح رائق النبذ ثم يخفف في سلسلة التخافيف (تقنية التخفيف)، وفي حالة زرع الراسب المكسر مباشرة على وسط اكار الفارنيت والمزرعة ثنائية الطور يلاحظ وجود اشكال متميزة، اما زرع الرائق المرشح على وسط الفارنيت السائل اظهر وجود اشكال كروية كبيرة، بعض منها متطاول وهي اصل البكتريا فاقدة الجدار ونشأت من هذه الوحدات (ERUs)، لوحظ وجود اشكال بكتيرية فاقدة للجدار الخلوي جزيئاً، واخيراً لوحظ اشكال راجعة الى الشكل ذي الجدار (Revertant bacteria) كما موضح في شكل (٤ -٢).

٤-١-٥: المسببات البكتيرية المشاركة في خمج المفاصل المزمن وعلاقتها بالجنس.

اوضحت نتائج الدراسة الحالية ان المكورات العنقودية الذهبية *(S.aureus)* فاقدة الجدار كانت ذات سيادة واضحة بنسبة ٢٠%، ثم تلتها الاشريكيا القولونية *E.coli* بنسبة ١٣.٣%، ثم الكليبسيلا الرئوية *K. pneumoniae* بنسبة ١٠%، واخيراً كل من المكورات المسبحية المقيحة *S.pyogenes* نمط A ووتديات الخناق *C. diphtheriae* كانت بنسبة ٣.٣% وكانت نسبة الاصابة البكتيرية في الاناث اعلى ٣٠% مقارنة مما عليه بالذكور اذ كانت نسبة الاصابة ٢٠% وخاصة المكورات العنقودية الذهبية اذ كانت في الاناث اعلى وبنسبة ١٣.٣٥% مما عليه في الذكور وبنسبة ٦.٦٥% وكما موضح في جدول (٤-١٢).

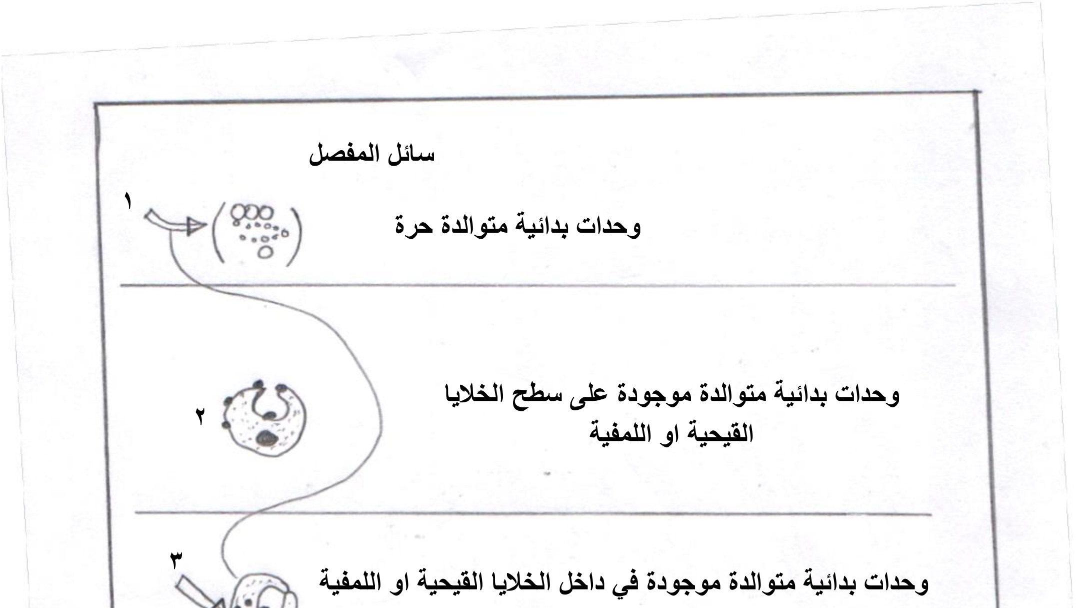
جدول (٤-١٢): توزيع المسببات البكتيرية المرافقة لخمج المفاصل المزمن حسب الجنس.

المسبب	ذكر *		انثى **		الكلي	
	عدد	%	عدد	%	عدد	%
المكورات العنقودية الذهبية	٢	٦.٦٥	٤	١٣.٣٥	٦	٢٠
المسبحيات القيحية	٠	٠	١	٣.٣٥	١	٣.٣٥
وتديات الخناق	١	٣.٣٥	٠	٠	١	٣.٣٥
الاشريكيا القولونية	٢	٦.٦٥	٢	٦.٦٥	٤	١٣.٣٥
الكليبسيلا الرئوية	١	٣.٣٥	٢	٦.٦٥	٣	١٠
العددالكلي	٦	٢٠	٩	٣٠	١٥	٥٠

* الزرع السالب=٧

** الزرع السالب=٨

شكل (٤



شكل (٤-٢): المخطط العام لدورة حياة البكتريا فاقدة الجدار في خمج المفاصل حسب نتائج الزرع في هذه الدراسة

٤-١-٦: الحساسية الدوائية للبكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار المعزولة من مرضى خمج المفاصل.

٤-١-٦-١: الحساسية الدوائية للبكتريا الموجبة لصبغة گرام

تبين من الجدول (٤-١٣) بأن المكورات العنقودية الذهبية كانت حساسة للكلورامفينكول والستربتومايسين والتتراسايكلين بنسبة ٦٦.٧% لكل منهم. بينما كانت مقاومة لكل من الامبسلين والكلوكساسلين والترايميثوبريم وبنسبة ١٠٠% لكل من هذه المضادات الثلاثة.

٤-١- ٦-٢: الحساسية الدوائية للبكتريا السالبة لصبغة گرام

تبين من الجدول (٤-١٤) بأن الاشريكيا القولونية كانت حساسة للناليديكسيك اسد بنسبة ٧٥%. بينما كانت مقاومة لاغلب المضادات الحياتية خاصة السيفاتوسيم والامبسلين والكلوكساسلين والارثرومايسين والريفامبسين بنسبة ١٠٠%. اما الكليبسيلا فكانت مقاومة لاغلب المضادات الحياتية وبنسبة ١٠٠%.

٤-١-٧ :قرائن اختيار سلالات الخمج التجريبي :.

تم اختيار المكورات العنقودية الذهبية واشريكيا القولون في الخمج التجريبي للمفاصل في هذه الدراسة وذلك نظرا لسيادة الاولى من بين السلالات البكتيرية الموجبة لصبغة غرام بنسبة ٢٠% وسيادة الثانية من بين السلالات البكتيرية السالبة لصبغة غرام ١٣.٣٥%.

٤-٢: الخمج التجريبي

٤-٢-١ مظاهر الخمج وعلامات المرض التجريبي

٤-٢-١-١: تأثير الخمج التجريبي على وزن الحيوانات طوال مدة التجربة. من خلال ملاحظة جدول (٤-١٥) يتبين بأن وزن الحيوانات المختبرية (ذكور الارانب) في تجربة حقن العالق البكتيري موضعياً في المفصل سواء بالبكتريا الفاقدة للجدار او ذات الجدار يتناقص بشكل كبير خلال مدة التجربة اذ ان الفقدان بالوزن يكاد يصل الى ٢٥٠ غم، اما بالنسبة لوزن الحيوانات في تجربة الحقن الوريدي كان النقصان بالوزن ضئيل جداً و لا يتجاوز ١٠٠ غم.

جدول (٤-١٥): تأثير الخمج التجريبي على وزن الحيوانات طوال مدة التجربة.

معدل قيمة الفقد بالوزن بالغرام	معدل وزن الارانب لمكررين بعد التجربة بالغرام	معدل وزن الارانب لمكررين قبل التجربة بالغرام	طريقة الحقن	ت
٥٢ ٦١	١٥٢٣ ١٢٢٤	١٥٧٥ ١٢٨٥	CWDEc/IV CWDSa/IV	١
٢٤٢ ١٢٧	١٢٥٨ ١٣١٠	١٥٠٠ ١٤٣٧	CWDEc/IA CWDSa/IA	٢
٩٣ ٦٨	١٣٣٢ ١٢٥٩	١٤٢٥ ١٣٢٧	CWEc/IV CWSa/IV	٣
٢٤٦ ١٨٠	٩٤٩ ٩٣٤	١١٩٧ ١١٠٠	CWEc/IA CWSa/IA	٤
٤٣	١٣٠٢	١٣٤٥	السيطرة (IV)	٥
٥٠	١٥٣٠	١٥٨٠	السيطرة (IA)	٦

الاشريكيا القولونية Ec: *E. coli*؛ بكتريا ذات الجدار , CW: Cell Wall ؛ CWD: بكتريا فاقدة للجدار;Cell Wall Defective ؛ حقن بالمفصل IA Intra-articular . حقن بالوريد IV Intravenous ؛ المكورات العنقودية الذهبية ,Sa: *Staphylococcus aureus*.

٤-٢-١-٢: علاقة الخمج البكتيري التجريبي مع ظهور الاعراض على الارانب المخمجة

٤-٢-١-٢ -١ تجربة الحقن بالوريد.

في تجربة الحقن بالوريد، كانت اعراض فقد الوزن ضئيلة مقارنة بتجربة الحقن المباشر بالمفصل، اما بالنسبة للغذاء فأظهرت الحيوانات المحقونة بكلا النوعين من البكتريا الفاقدة للجدار وذات الجدار (العنقوديات والاشريكيا) عدم رغبتها للطعام خلال مدة التجربة، اما بالنسبة للاعراض السريرية فكانت الحيوانات المحقونة بالبكتريا فاقدة الجدار اكثر وضوحاً مما عليه في الحيوانات المحقونة بذات

الجدار، وكانت اعراض التهاب المفاصل اكثر وضوحاً في العنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار من ذات الجدار وحتى اكثر وضوحاً من الاشريكيا القولونية بنوعيها الفاقدة للجدار وذات الجدار، واخيراً حصلت حالتي وفاة في الحيوانات المحقونة بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار ولم تحصل هذه الحالة في بقية الحيوانات كما في جدول (٤-١٦).

٤-٢-١-٢-٢: تجربة الحقن الموضعي بالمفصل.

كانت اعراض فقد الوزن واضحة بشكل كبير في هذه التجربة في جميع الحيوانات المصابة تجريبياً، كما ظهرت في هذه التجربة حالات عرج على الحيوانات المحقونة بالاشريكيا القولونية الفاقدة للجدار وذات الجدار وبالدرجة نفسها. وكانت هذه الحالة اقل وضوحا في العنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار، اما بالنسبة للعنقوديات ذات الجدار فتكاد تكون هذه الحالة معدومة. اما بالنسبة لتورم المفصل فظهر واضحاً في الحيوانات المحقونة بالاشريكيا القولونية بنوعيها الفاقدة للجدار وذات الجدار. كما ظهر واضحاً ايضاً في العنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار، وكان اقل وضوحاً في العنقوديات الذهبية ذات الجدار. واخيراً ظهرت حالة وفاة واحدة في الحيوان المحقون بالاشريكيا القولونية ذات الجدار ولم تظهر هذه الحالة في الحيوانات الاخرى كما هو موضح في جدول (٤-١٧) والاشكال (٤-٣، ٤-٤، ٤-٥، ٤-٦، ٤-٧).

جدول (٤-١٦): ظهور الاعراض المرضية مع الخمج التجريبي عبر الحقن الوريدي.

ت	الاعراض	المكورات العنقودية الذهبية		الاشريكيا القولونية		السيطرة Control
		CW	CWD	CW	CWD	
١	فقدان الوزن	٦٨	٦١	٩٣	٥٢	٤٣
٢	التغذية	لا يوجد تغير واضح				

٣	الخمول	+	++	+	++	-
٤	التهاب المفصل	+	++	±	+	-
٥	الوفيات	-	++	-	-	-
٦	العرج	-	-	-	-	-

جدول (٤-١٧): ظهور الاعراض المرضية مع الخمج التجريبي عبر الحقن الموضعي بالمفصل.

ت	الاعراض	المكورات العنقودية الذهبية		الاشريكيا القولونية		Control
		CW	CWD	CW	CWD	
١	فقدان الوزن	١٨٠	١٢٧	٢٤٦	٢٤٢	٥٠
٢	التغذية	اقل رغبة عما قبل التجربة				-
٣	الخمول	+	+	+	+	-
٤	التهاب المفصل	-	++	++	++	-
٥	الوفيات	-	-	+	-	-
٦	العرج	-	+	++	++	-

CWD : البكتريا الفاقدة للجدار، CW: البكتريا ذات الجدار.

شكل (٤-٣): وجود حالة العرج في الحيوان المصاب عند الحقن الموضعي عبر المفصل.

شكل (٤-٤): عدم وجود حالة العرج في حيوان السيطرة.

شكل (٤-٥): وجود حالة الورم في مفصل الحيوان المصاب عند الحقن الموضعي عبر المفصل.

شكل (٤-٦): عدم تورم مفصل حيوان السيطرة.

٤-٢-٢ الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة غرام لسائل المفصل المسحوب من مفاصل الحيوانات المصابة.

٤-٢-٢-١: في تجربة الحقن الوريدي:

أ- العنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار

عند الفحص المجهري للمسحات المصبوغة بصبغة غرام والمأخوذة من سائل المفصل، تم ملاحظة تجمعات بكتيرية غير واضحة الجدار، كما لوحظ بعض الخلايا البكتيرية كانت فاقدة جزيئاً للجدار اذ كان جزء من جدارها واضح المعالم وذا لون غامق، والجزء الاخر شفاف وغير واضح، كما لوحظ وجود خلايا بكتيرية طبيعية كروية الشكل ومتجمعة بشكل ثنائي او ثلاثي او مفرد او عناقيد متفككة، كما لوحظ وجود خلايا التهابية (متعددة الانوية، ووحيدة النواة)، كما لوحظ خلايا التهابية ملتصقة عليها خلايا بكتيرية كروية كما موضح في الشكل (٤-٧)

ب- العنقوديات الذهبية ذات الجدار

من خلال الفحص المجهري لمسحات سائل المفصل المصبوغة والمسحوبة من مفاصل الحيوان المصاب تجريبياً والمحقونة بالمكورات العنقودية الذهبية ذات الجدار عبر الحقن الوريدي لم يلاحظ وجود خلايا بكتيرية.

ج- الاشريكيا القولونية الفاقدة للجدار

من خلال الفحص المجهري لمسحات سائل المفصل المصبوغة والمسحوبة من مفاصل الحيوان المصاب تجريبياً والمحقونة بالاشريكيا القولونية الفاقدة للجدار عبر الحقن الوريدي لوحظ وجود تجمعات بكتيرية فاقدة كلياً للجدار، كما وجدت خلايا بكتيرية متجمعة بهياة مجاميع او بشكل مفرد كما في الشكل (٤-٨)

د- الاشريكيا القولونية ذات الجدار

من خلال الفحص المجهري لمسحات سائل المفصل المصبوغة والمسحوبة من مفاصل الحيوان المصاب تجريبياً والمحقونة بالاشريكيا القولونية ذات الجدار عبر الحقن الوريدي لوحظ وجود خلايا بكتيرية عصوية ذات جدار كما موضح في الشكل (٤-٩)

٤-٢-٢-٢: في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل

أ- العنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار

نتـائج الفحص المجهري المباشر لمسحات سائل المفصل المصبوغة بصبغة غرام تشير الـى وجود مدمج خلوي على شكل عنقود حاوي خلايـا بكتيريـة فاقدة للجدار الخلـوي جزئيـاً Partial cell) (wall defective bacteria. كما في الشكل (٤-١٠).

ب- العنقوديات الذهبية ذات الجدار

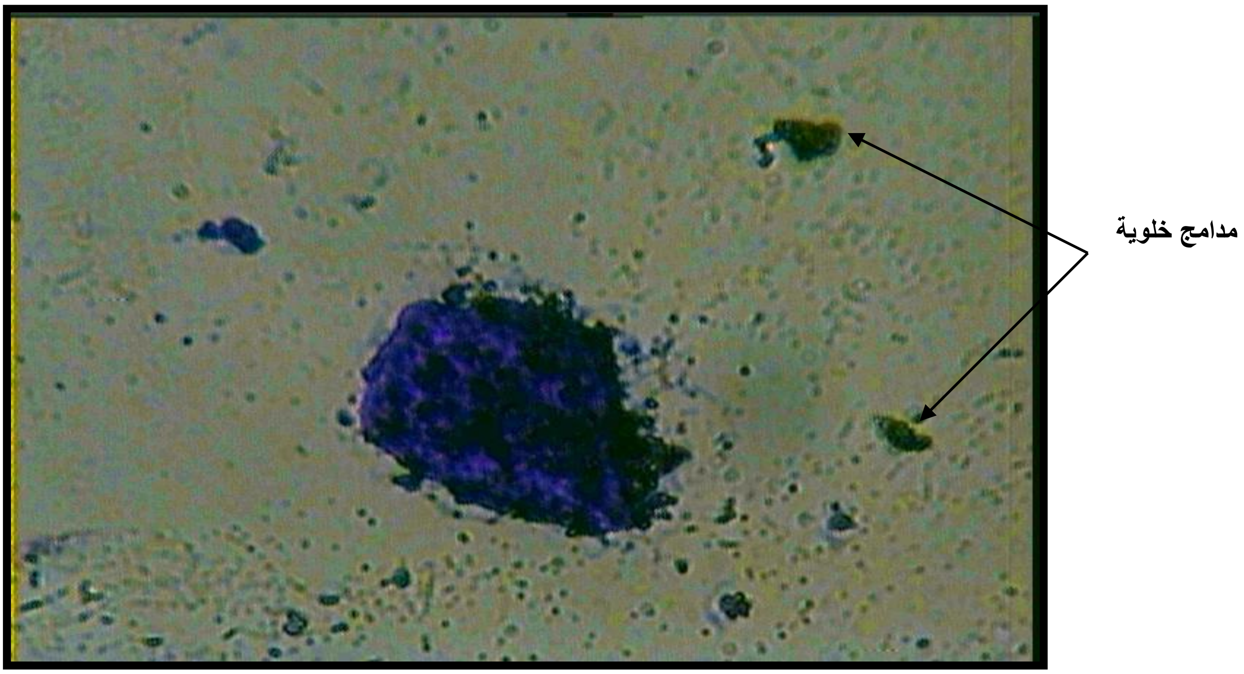
لم يتم ملاحظة خلايا بكتيرية عتد الفحص المجهري للمسحات المصبوغة بصبغة غرام .

ج- الاشريكيا القولونية الفاقدة للجدار

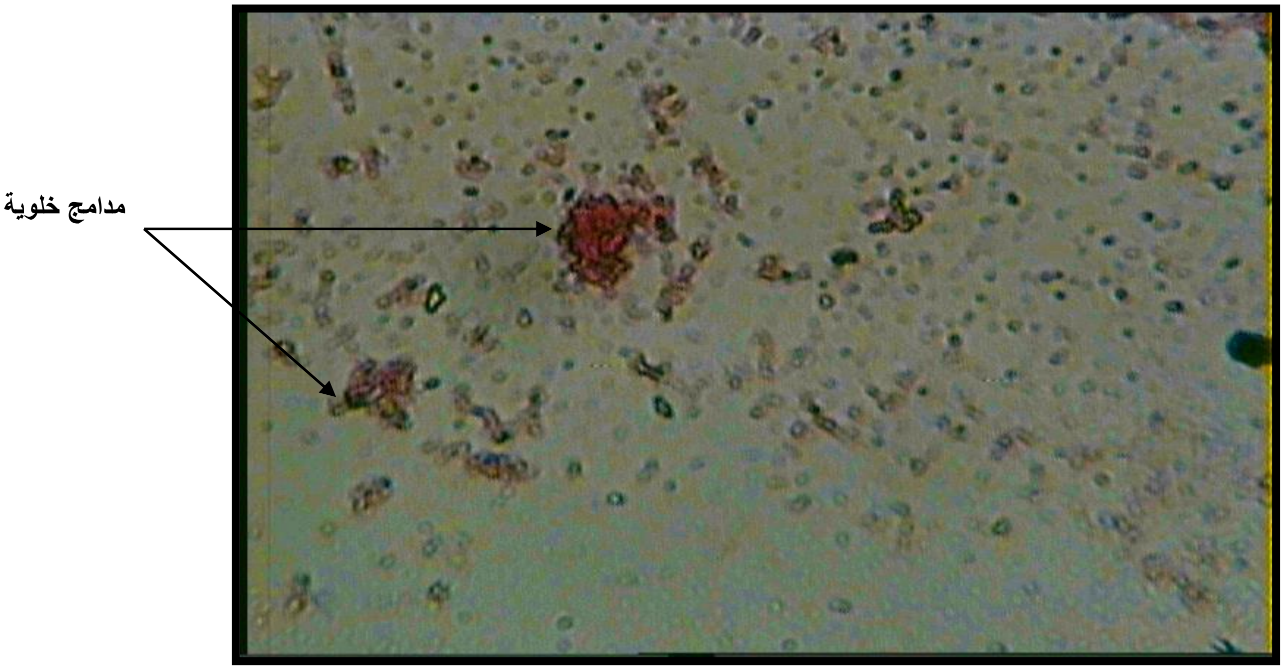
اظهرت نتـائج الفحص المجهري وجود مدامج خلويـة ذات منـاطق غامقة وفاتحـة دلالـة علـى الفقدان الجزئي للجدار الخلوي، كما لوحظ وجود مدامج خلويـة نموذجيـة ووجود مواد مخاطيـة لزجـة، كما لوحظ وجود خلايا بكتيرية طبيعية، ووجود خلايا بكتيرية متعددة الاشكال (Pleomophism) كما في الشكل (٤-١١).

د- الاشريكيا القولونية ذات الجدار

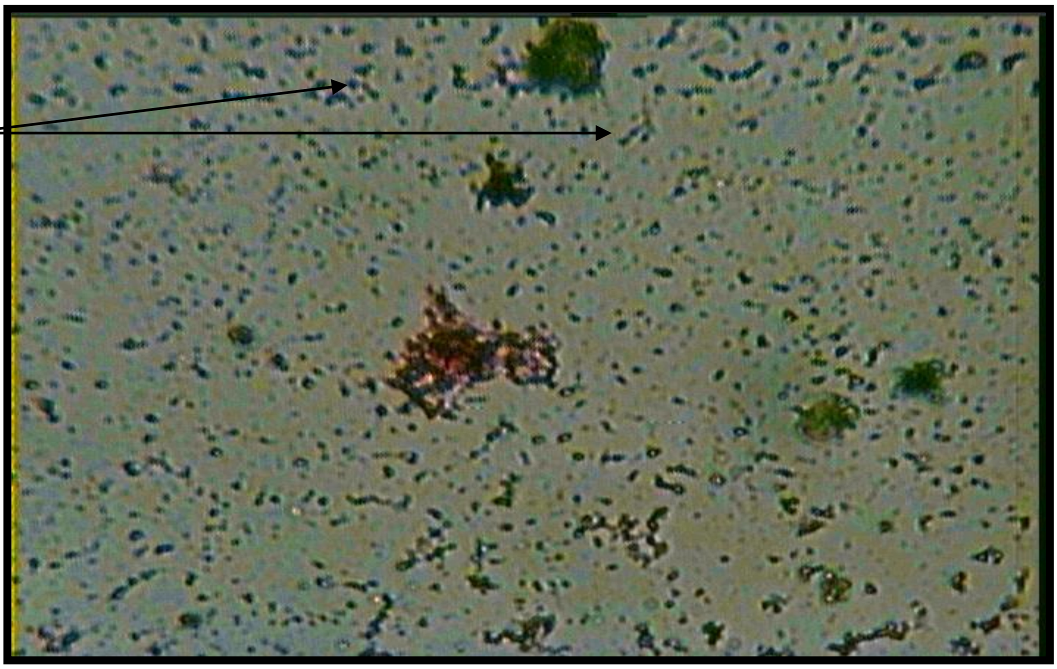
اوضـح الفحـص المجهـري للمسـحات المصـبوغة بصـبغة غـرام الـى وجـود عصـيات طويلـة، كمـا لوحظوجود تجمعات كثيفة للخلايا البكتيريةو كأنها مأخوذة من نمو زرعي بكتيري كما في الشكل (٤-١٢)



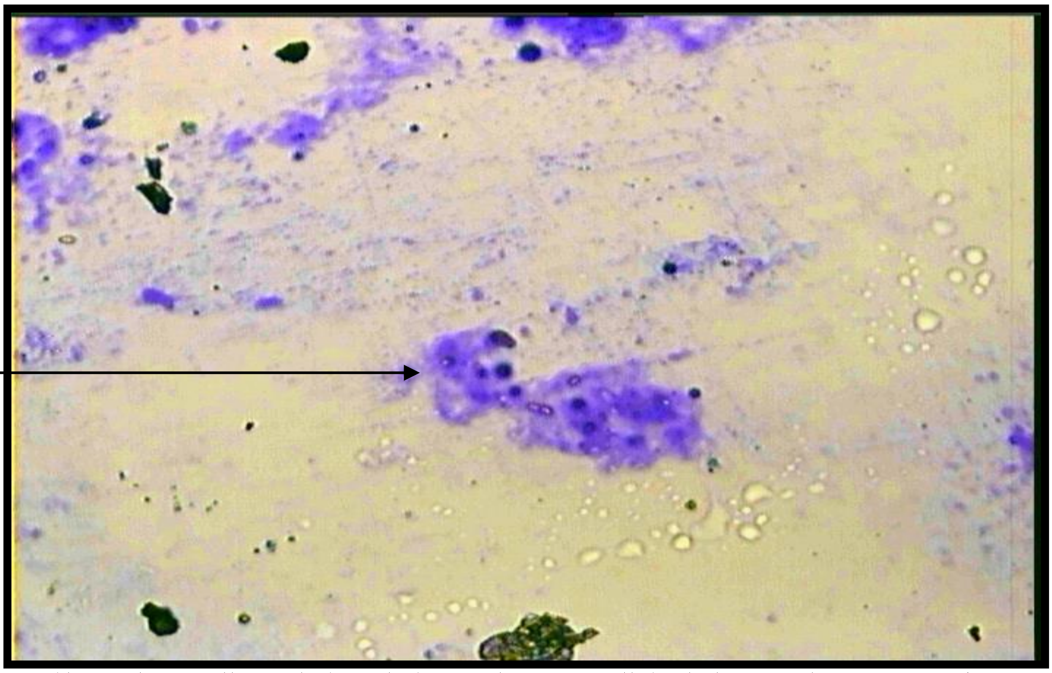
شكل (٤-٧): المدامج الخلوية للعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفاصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة ١٠٠X.



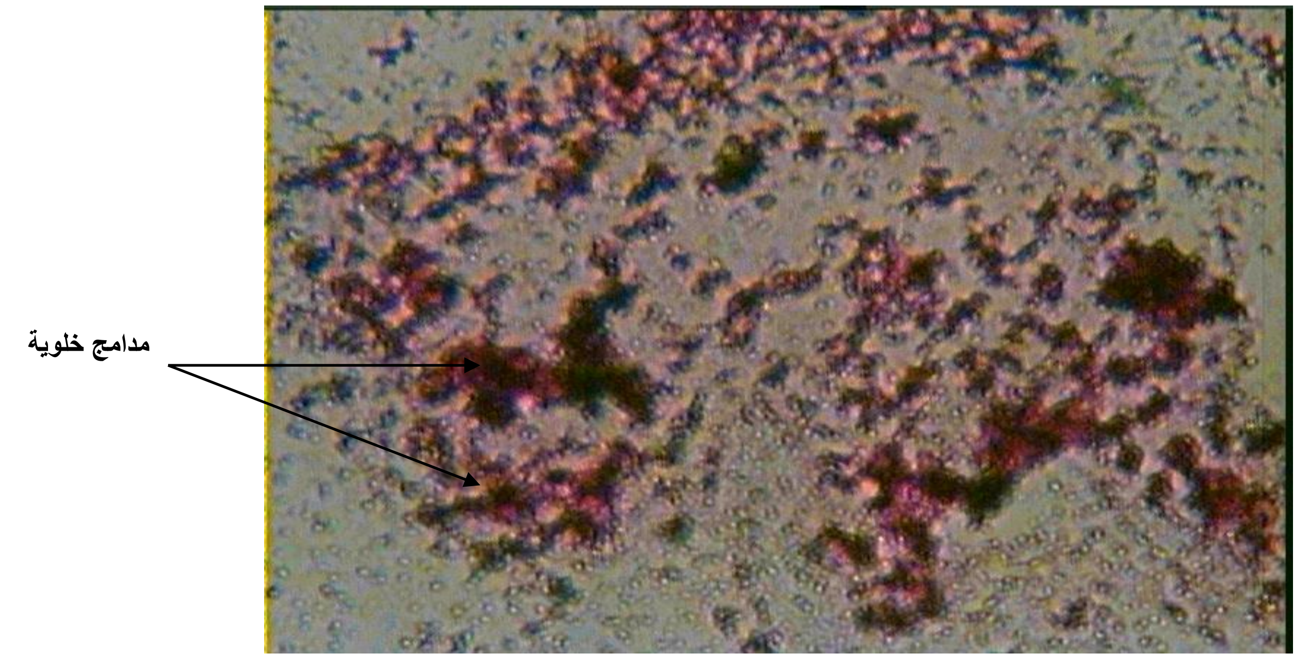
شكل (٤-٨): المدامج الخلوية لاشريكيا القولون الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة ١٠٠X.



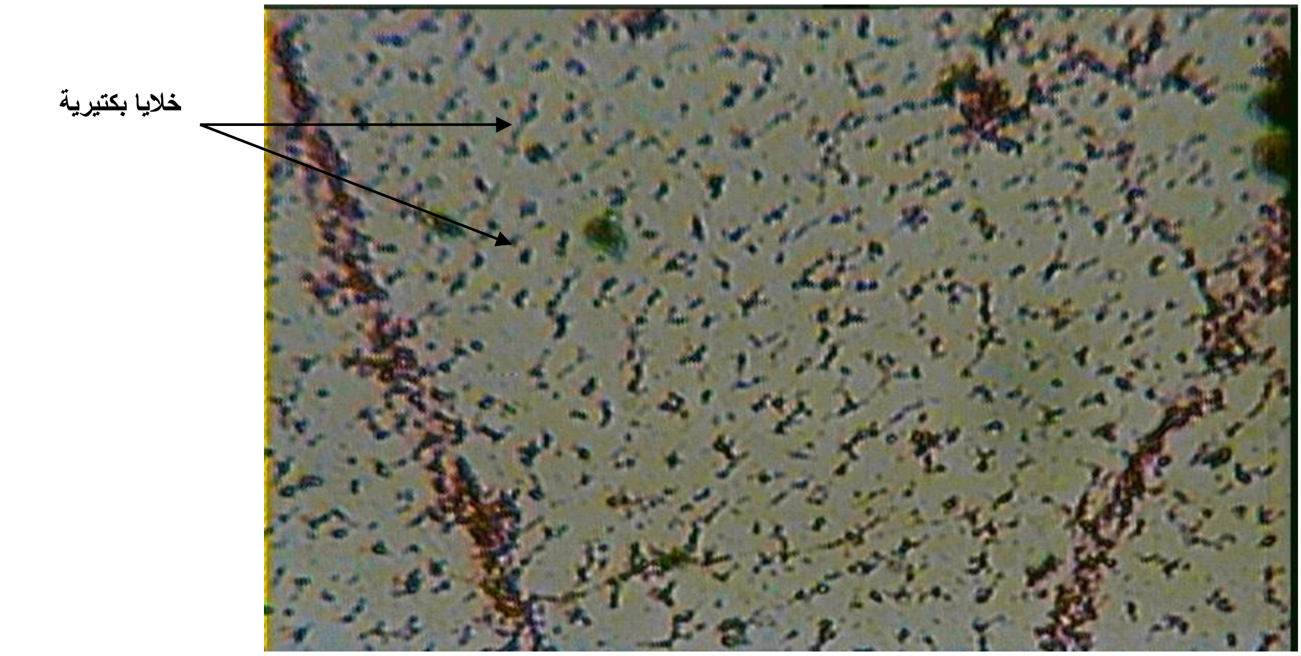
شكل (٤-٩): بكتريا اشريكيا القولون ذات الجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن بالوريد على قوة X١٠٠.



شكل (٤-١٠): المدامج الخلوية للمكورات العنقودية الذهبية الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X ١٠٠.



شكل (٤-١١): المدامج الخلوية لاشريكيا القولون الفاقدة للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X١٠٠.



شكل (٤-١٢): بكتريا اشريكيا القولون ذات للجدار المعزولة من سائل المفصل للارانب المخمجة في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل على قوة X١٠٠ .

٤-٢-٣: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة ليشمان لرسابة سائل المفصل المسحوب من الحيوانات المصابة:

٤-٢-٣-١: في تجربة الحقن الوريدي

من خلال الفحص المجهري للمسحات رسابة سائل المفصل المصبوغة بصبغة ليشمان اوضحت وجود خلايا التهابية قليلة مقارنة بتجربة الحقن المباشر بالمفصل وفي جميع الحيوانات بغض النظر عن نوع البكتريا المحقونة او كونها ذات جدار او فاقدة للجدار.

٤-٢-٣-٢: في تجربة الحقن الموضعي في المفصل

١- في الحيوانات المحقونة بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار، لوحظ وجود خلايا التهابية كثيرة جداً وخلايا قيحية.

٢- في الحيوانات المحقونة بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار، هناك خلايا التهابية لكن قليلة العدد وغير متميزة الانواع.

٣- في الحيوانات المحقونة بالاشريكيا القولونية الفاقدة للجدار، وجود خلايا التهابية كثيرة وحيدة النواة ومفصصة وخلايا اخرى وخلايا قيحية.

٤- في الحيوانات المحقونة بالاشريكيا القولونية ذات الجدار:وجود خلايا التهابية كثيرة وحيدة النواة ومفصصة وخلايا قيحية وغيرها .

٥- في الحيوانات الغير محقونة (حيوانات السيطرة): لم يتم ملاحظة أي نوع من الخلايا الالتهابية.

٤-٢-٤الفحص النسيجي للغشاء المفصلي للارانب المصابة تجريبياً:

٤-٢-٤-١ تجربة الحقن بالوريد (Intravenous Injection)

١- النسيج المصاب بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار.

اظهرت نتائج الفحوصات النسيجية للغشاء المفصلي للارانب المحقونةببكتريا العنقوديات الذهبية فاقدة الجدار الى وجود وذمة بينية خلوية بسيطة في الغشاء المفصلي كما موضح في الشكل (٤-١٣) A وB.

٢- النسيج المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار.

اظهرت نتائج الفحوصات النسيجية للغشاء المفصلي للارانب المحقونة ببكتريا العنقوديات الذهبية لا يوجد تغير واضح بالغشاء المفصلي كما موضح في الشكل (٤-١٤) A وB.

٣- النسيج المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار.

اظهرت نتائج الفحوصات النسيجية للغشاء المفصلي للارانب المحقونة ببكتريا اشريكاالقولون فاقدة الجدار الى وجود حالة نزف واحتقان وعائي واضح داخل الغشاء المفصلي، ولا وجود لخلايا التهابية كما موضح في الشكل (٤-١٥) A وB.

٤- النسيج المصاب باشريكيا القولون ذات الجدار.

لا يوجد تغير واضح بنسيج الغشاء المفصلي للارانب المحقونة ببكترياالشريكيا القولون ذات الجدار كما موضح في الشكل(٤- ١٦) A وB.

٤-٢-٤-٢: تجربة الحقن الموضعي بالمفصل(Intra-articular Injection)

١- النسيج المصاب بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار:

لوحظ وجود تغييرات نسيجية في غشاء المفصل للارانب المحقونة بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار موضعياالى وجود التهاب شديد مع تجمع وارتشاح خلايا التهابية حادة ومزمنة في الغشاء المفصلي مع وجود مناطق متقيحة (Pus cells) كما في الشكل (٤-١٧) A وB.

٢- النسيج المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار:

تشير نتائج الفحص النسيجي للغشاء المفصلي للارانب المحقونة بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار الى عدم وجود تغيرات في النسيج المصاب كما في الشكل (٤-١٨) A وB.

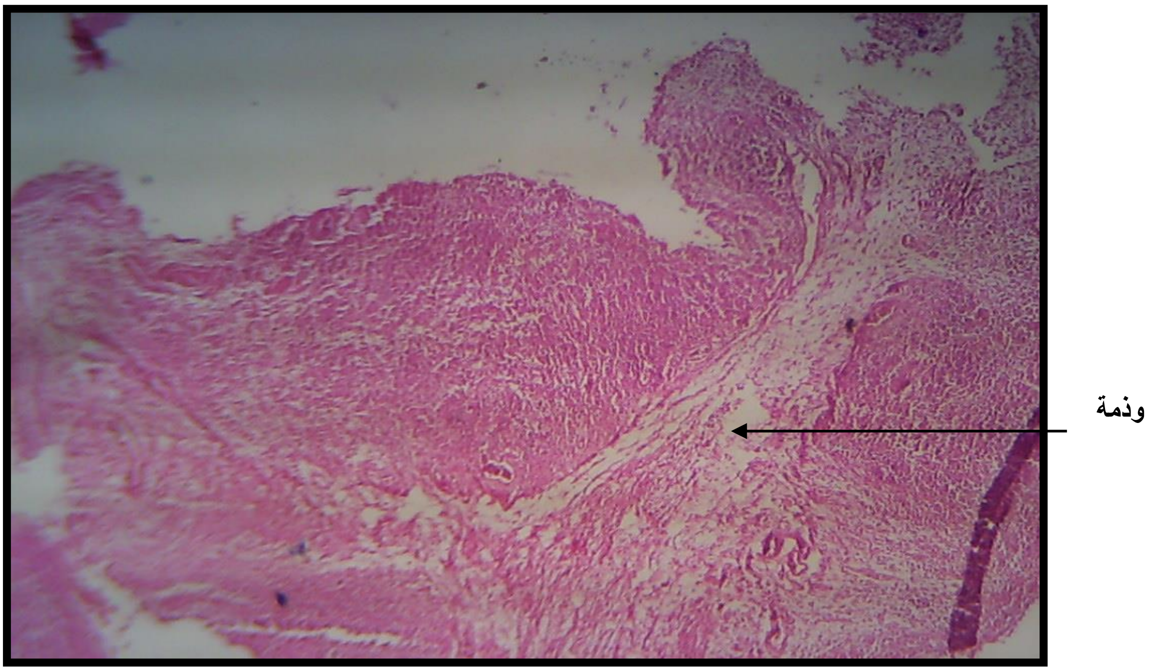
٣- النسيج المصاب بالاشريكيا القولونية فاقدة الجدار.

تشير نتائج الفحص النسيجي الى وجود التهاب شديد وارتشاح خلايا التهابية (عدلة Neutrophiles) واحادية النواة(Monocytes) في الغشاء المفصلي مع احتقان وعائي وشمول الغضروف بهذا الالتهاب كما في الشكل (٤-١٩) A وB.

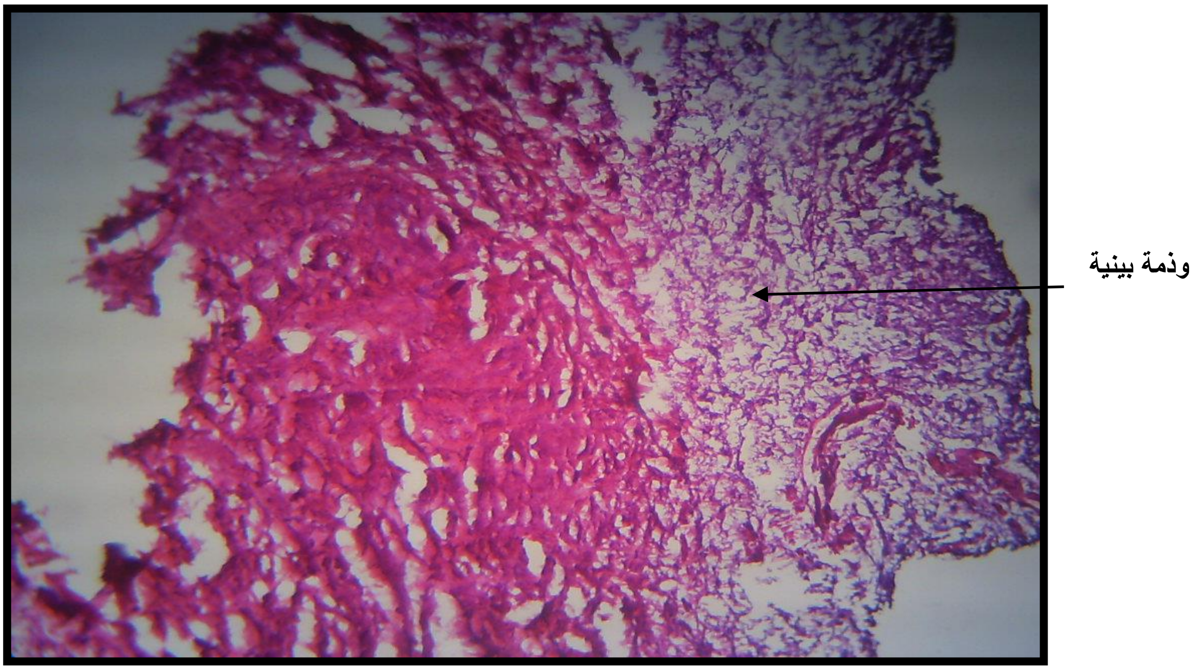
٤- النسيج المصاب بالاشريكيا القولونية ذات الجدار.

اظهر نتائج الفحص النسيجي المصاب بالاشريكيا ذات الجدارالى وجود تغيرات نسيجية من التهاب شديد ،خلايا قيحية , وذمة،واحتقان وعائي كما في الشكل (٤-٢٠) A وB.

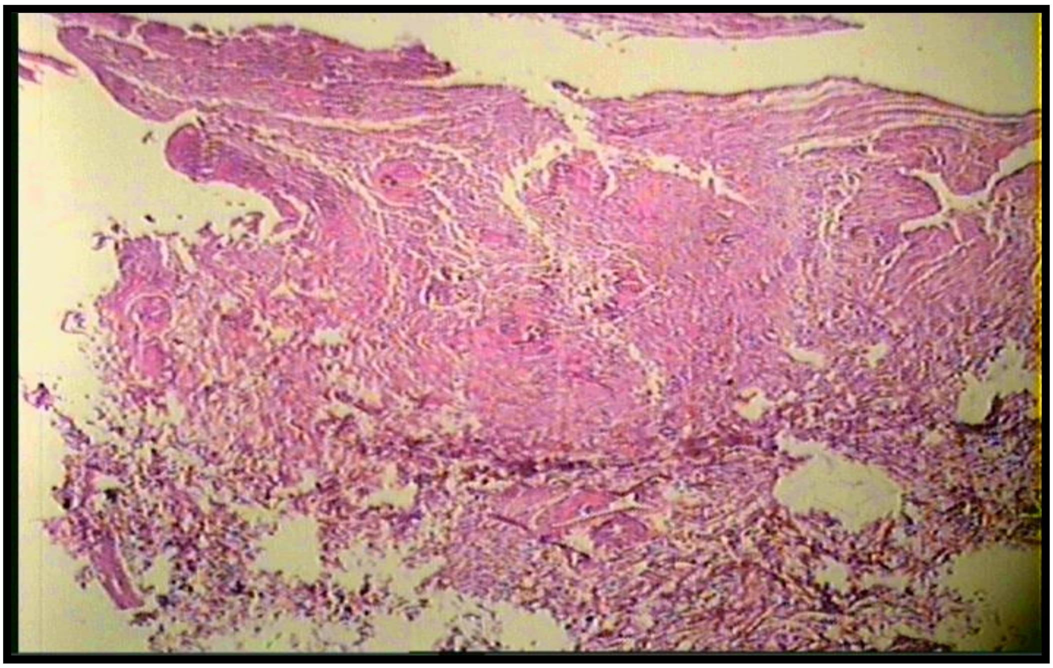
شكل (٤-١٣): نسيج غشاء المفصل للارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية فاقدة الجدار في تجربة الحقن بالوريد حيث لوحظ وجود وذمة بينية خلوية بسيطة في الغشاء المفصلي.



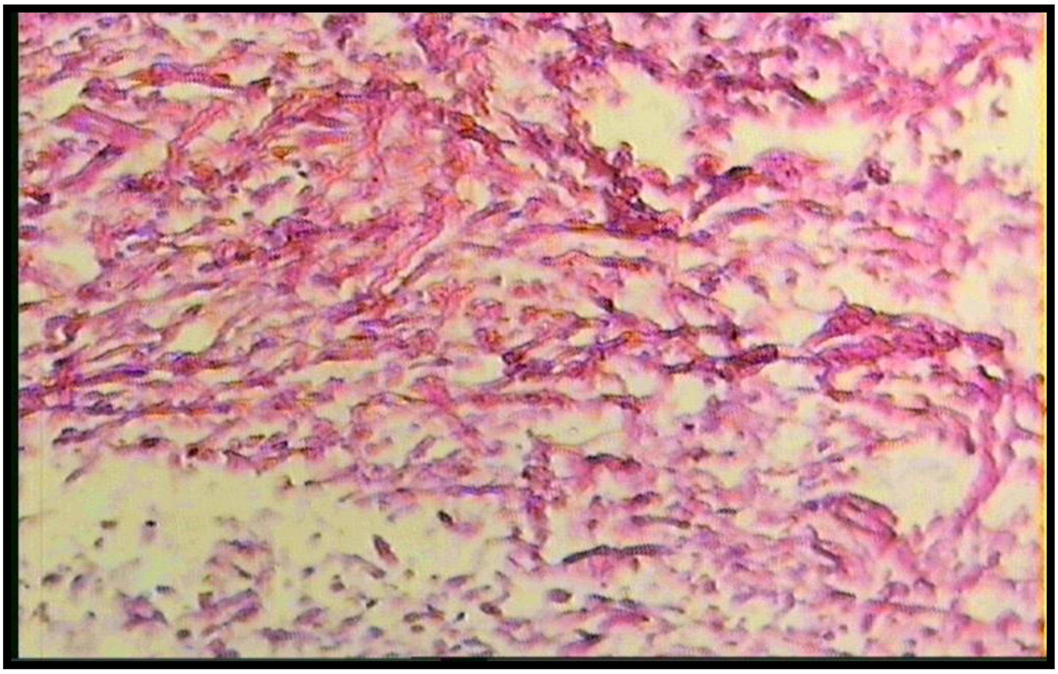
(٤-١٣-A):- بقوة تكبير X١٠ .



(٤-١٣-B):- بقوة تكبير X٤٠.

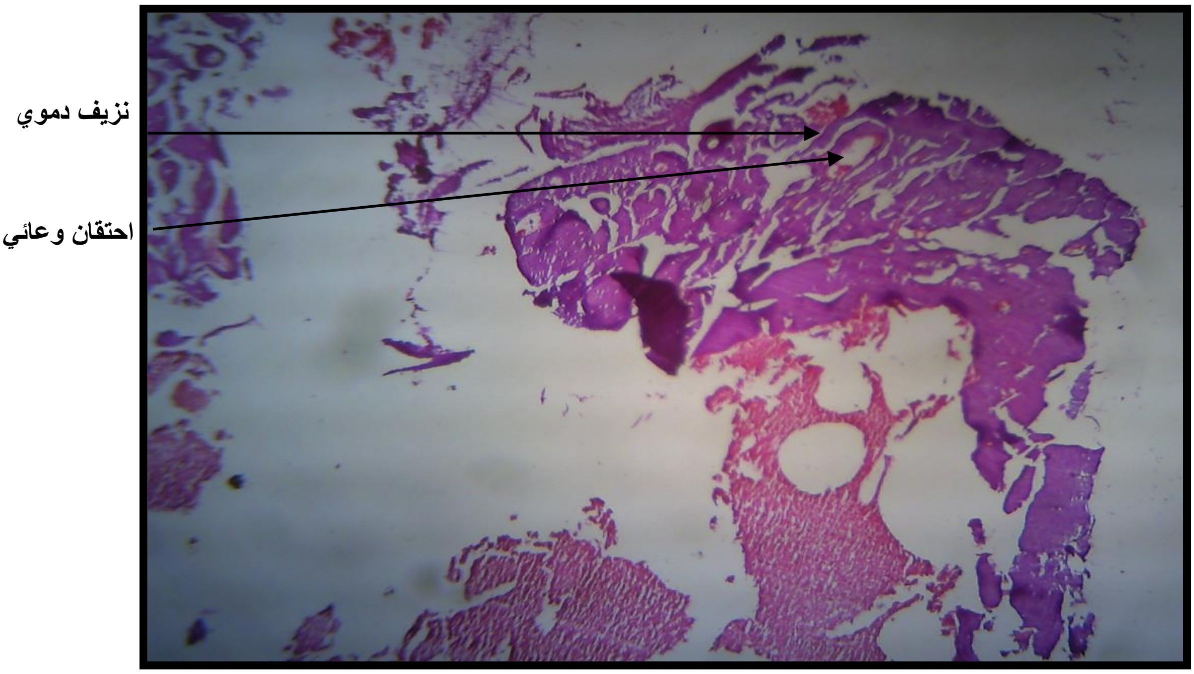


(٤-١٤-A):- بقوة تكبيرX ١٠ .

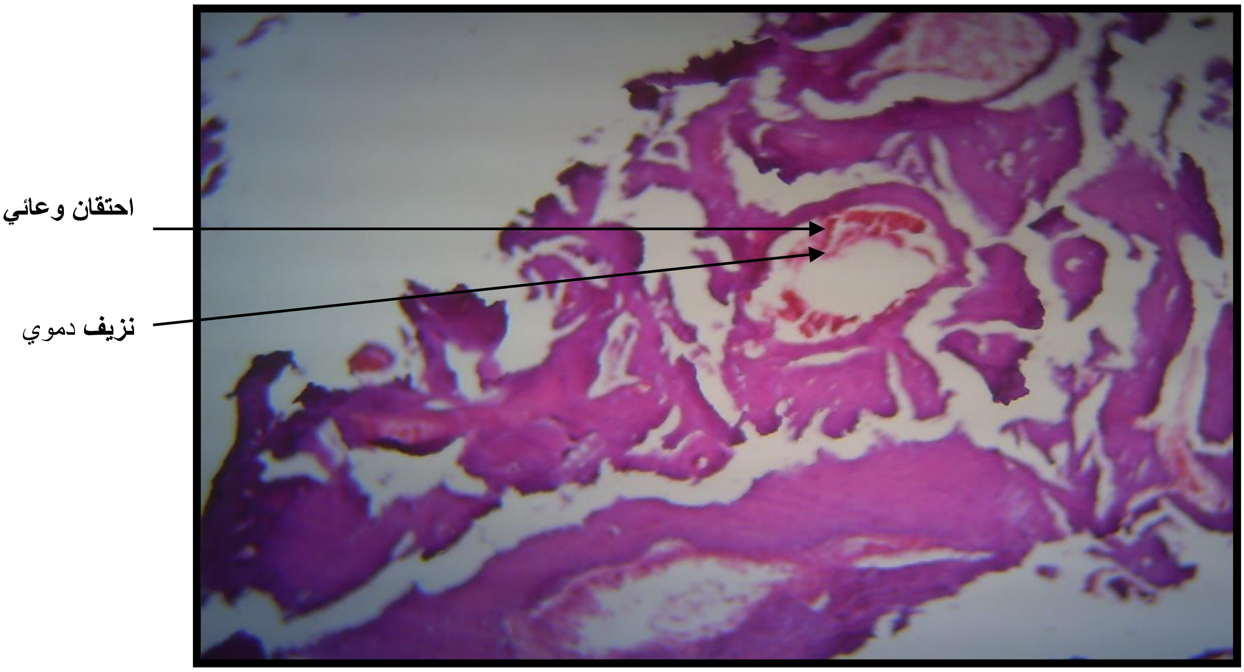


(٤-١٤-B):- بقوة تكبير X ٤٠.

شكل (٤-١٤): يوضح نسيج غشاء المفصل للارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار في تجربة الحقن بالوريد اذ لا يوجد وذمة بينية ولا نزيف دموي او احتقان وعائي او تفاعل التهابي.

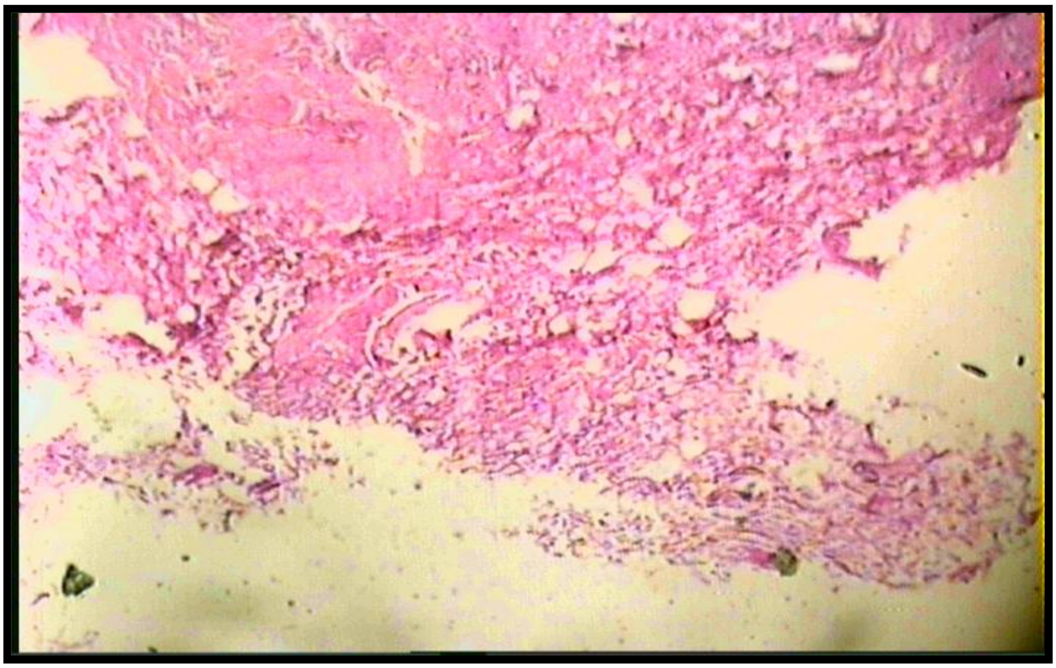


(٤-١٥-A): بقوة تكبير X ١٠.

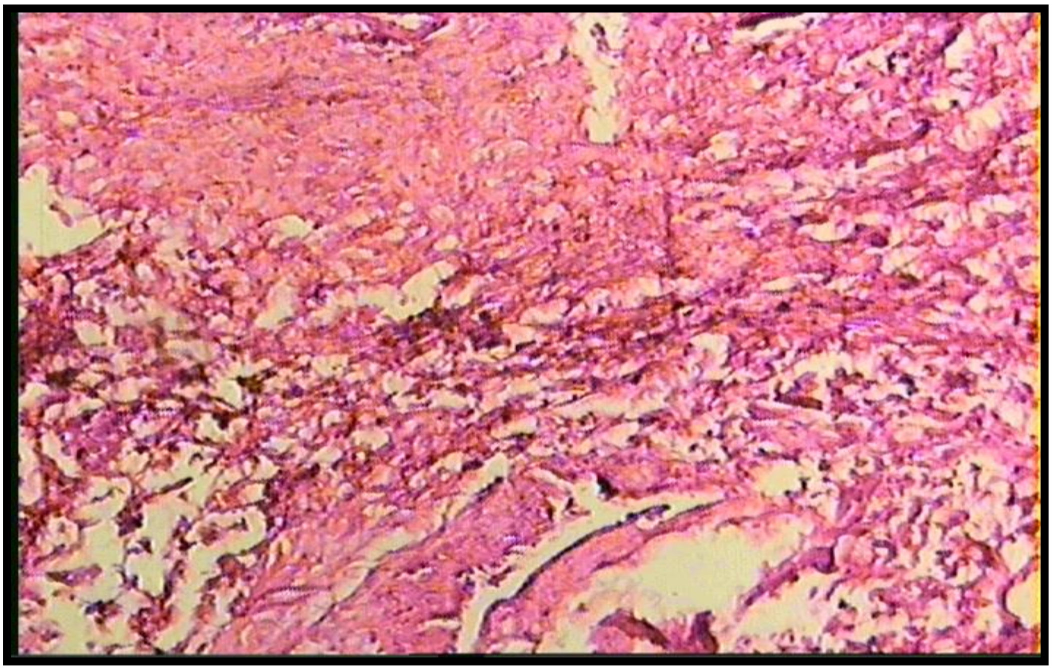


(٤-١٥-B): بقوة تكبير X ٤٠.

شكل (٤-١٥): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار في تجربة الحقن بالوريد حيث لوحظ وجود نزف دموي واحتقان وعائي

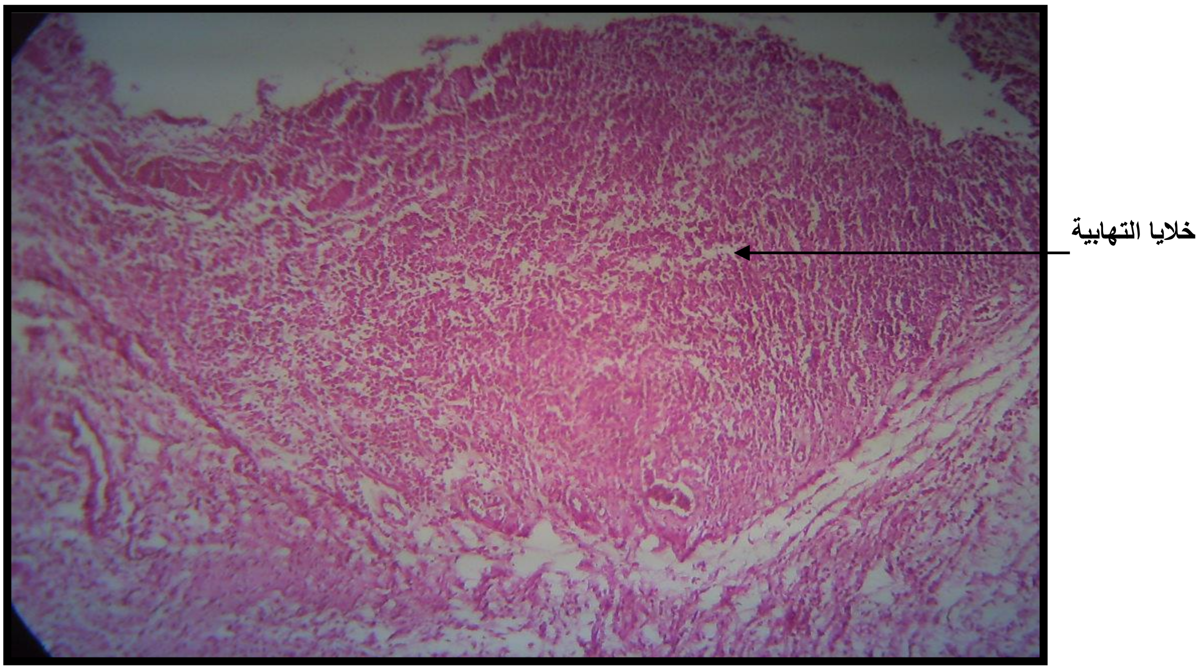


(٤-١٦-A): بقوة تكبير X ٤.

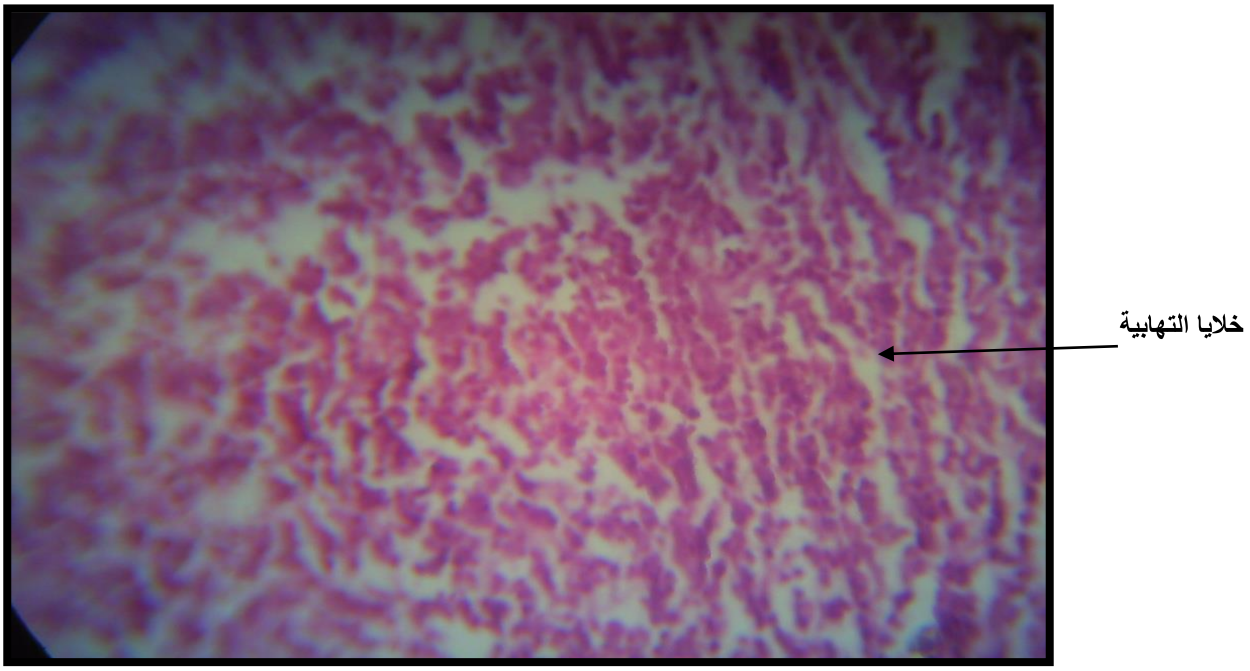


(٤-١٦-B): بقوة تكبير X ١٠.

شكل (٤-١٦): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل اذ لا توجد وذمة بينية ولا نزيف دموي او احتقان وعائي او تفاعل التهابي.

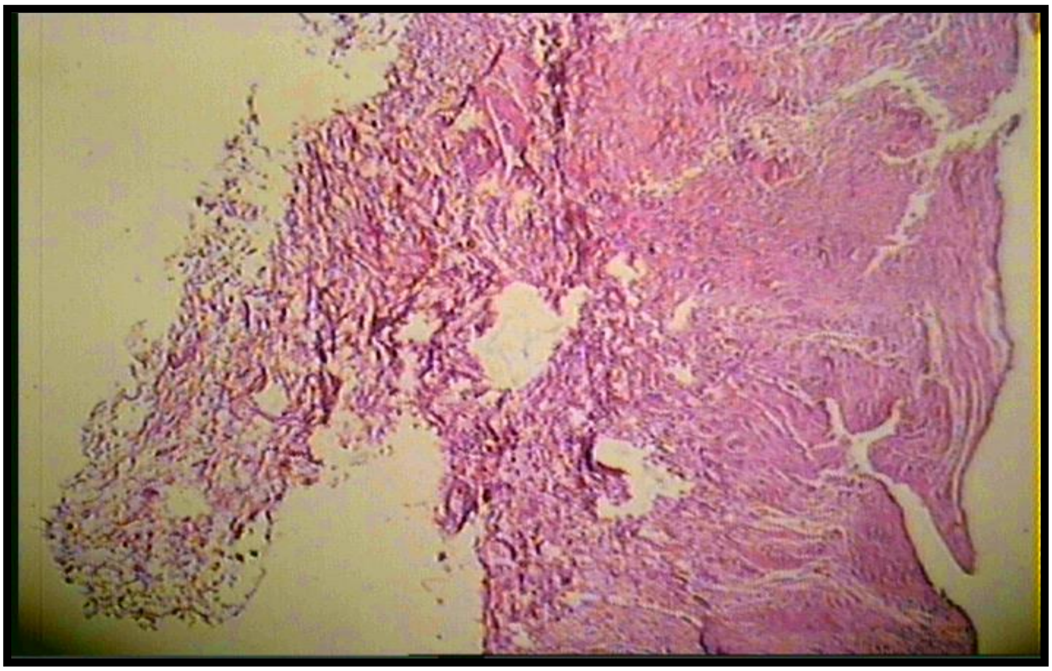


(٤-١٧-A): بقوة تكبير X ١٠.

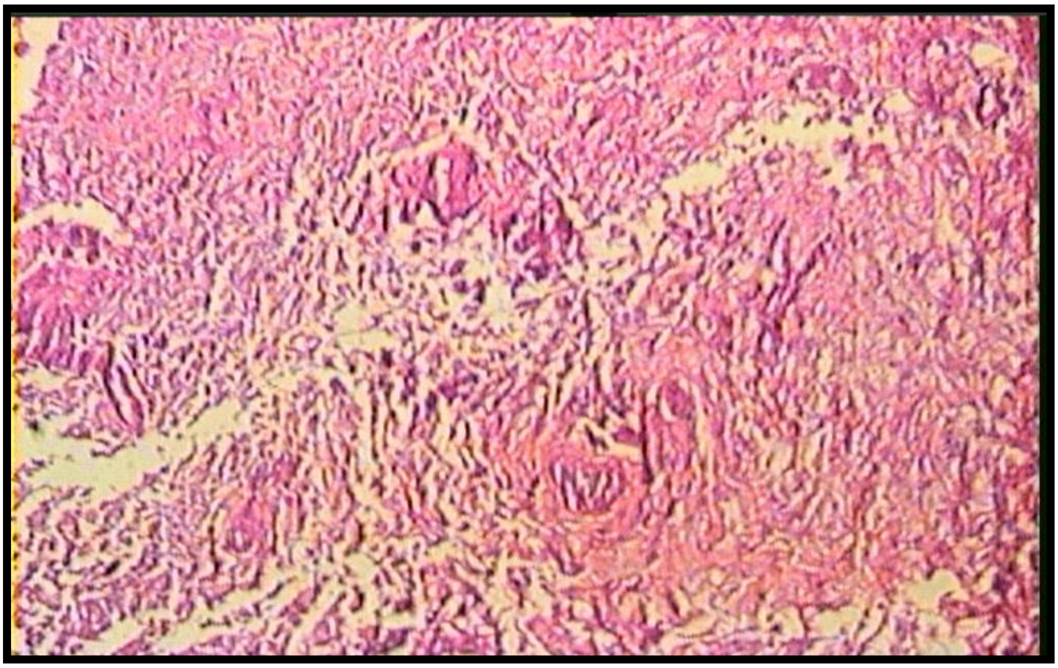


(٤-١٧-B): بقوة تكبير X ٤٠.

شكل (٤-١٧): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية فاقدة الجدار في تجربة الحقن بالوريد اذ لوحظ وجود التهاب شديد مع تجمع وارتشاح خلايا التهابية حادة ومزمنة في الغشاء المفصلي مع وجود مناطق متقيحة (Pus cells

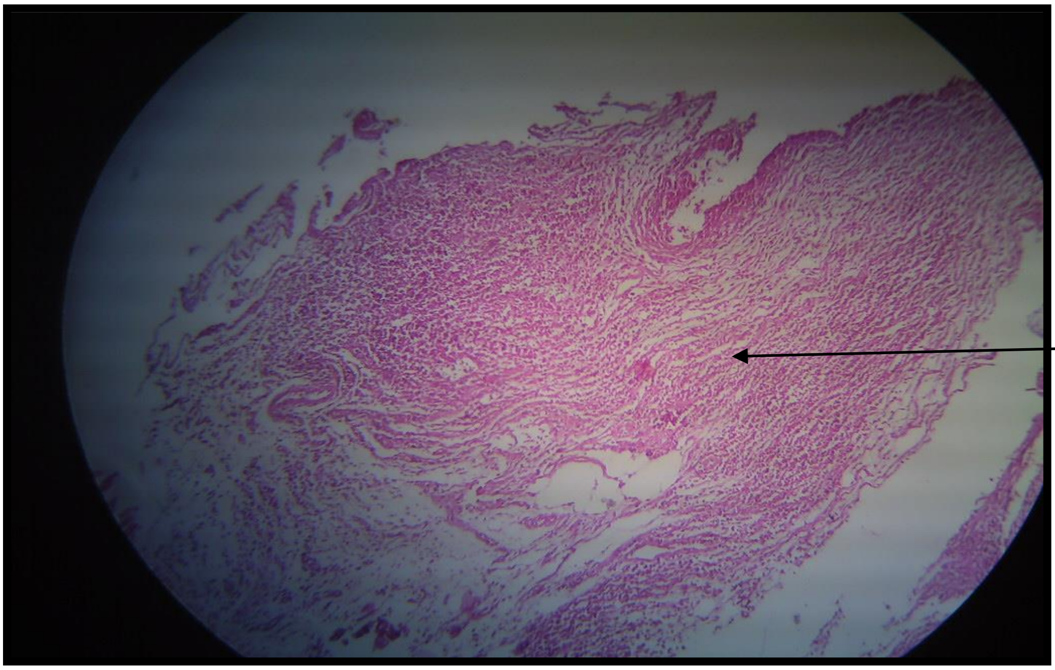


(٤-١٨-A): بقوة تكبير X ١٠.

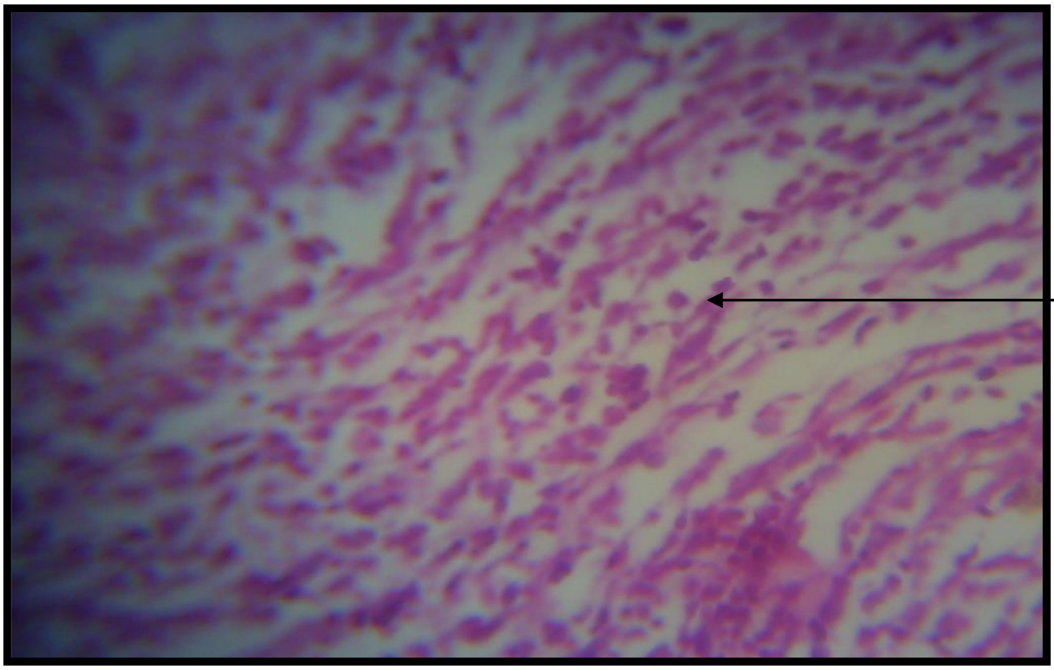


(٤-١٨-B): بقوة تكبير X ٤٠.

شكل (٤-١٨): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب بالعنقوديات الذهبية ذات الجدار في تجربة الحقن الموضعي في المفصل اذ لوحظ عدم وجود وذمة بينية ولا نزيف دموي او احتقان وعائي او تفاعل التهابي.



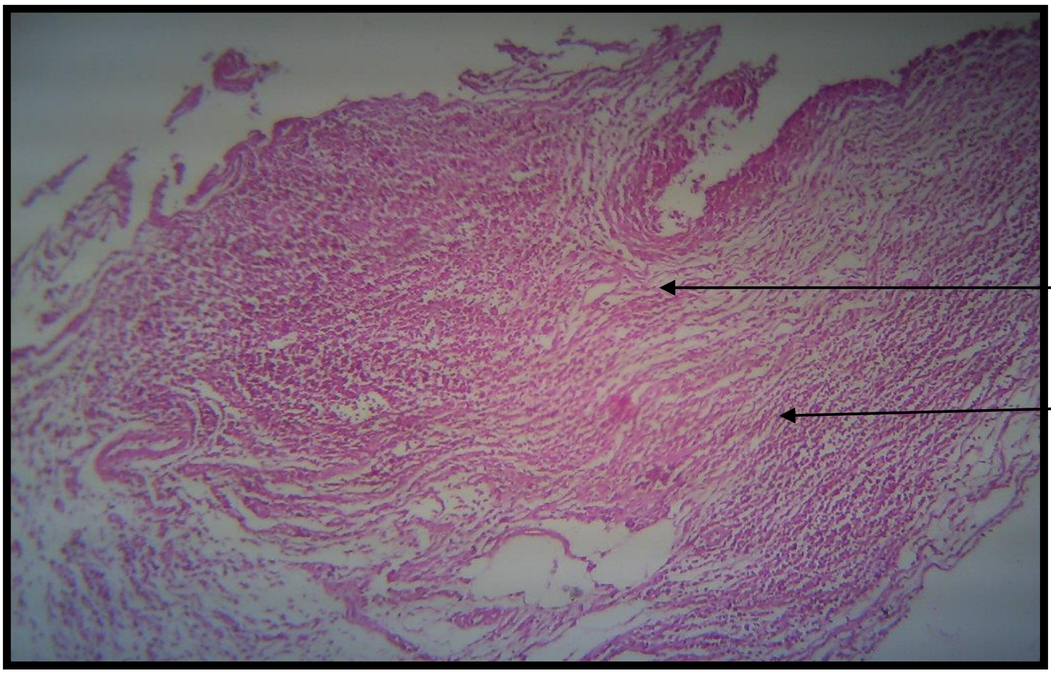
(٤-١٩-A): بقوة تكبير X ٤.



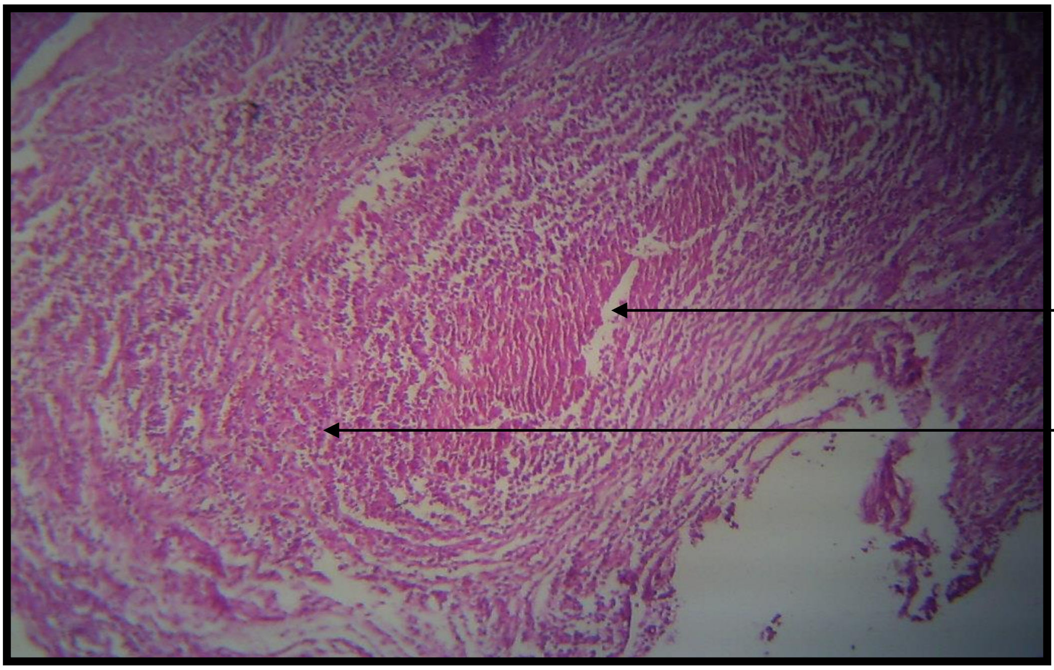
(٤-١٩-B): بقوة تكبير X ١٠٠.

شكل (٤-١٩): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل حيث لوحظ وجود التهاب شديد وارتشاح خلايا التهابية

شكل (٤-٩
يوضح
المدامج
الخلوية



(٤-٢٠-A): بقوة تكبير X ١٠.



(٤-٢٠-B): بقوة تكبير X ٤٠.

شكل (٤-٢٠): يوضح نسيج غشاء مفصل الارنب المصاب باشريكيا القولون ذات الجدار في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل حيث لوحظ وجود تغيرات نسيجية من التهاب شديد ،خلايا قيحية , وذمة،واحتقان وعائي

الفصل الخامس Chapter Five

المناقشة Discussion

٥-١: الخمج العفوي للمفاصل

٥-١-١: الفحص المباشر لمسحات رسابة سائل المفاصل المصبوغة بصبغة ليشمان

ان ارتشاح الخلايا العدلة بنسبة ٦.٦٥% ربما يوضح حدة الخمج التي تتخلل الحالات المزمنة للمرض (Rook & Balkwill, ١٩٩٨). بينما ارتشاح الخلايا احادية النواة في سائل المفصل بنسبة ٢٩.٩٥% فأنه يدل على الحالة المزمنة للمرض وهذه النتيجة تتوافق مع ما جاء به روزول وجماعته الذي اشار الى ارتشاح خلايا احادية النواة في تجويف المفصل عندما يحفز بسموم بكتيرية او متعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide) للبكتريا ونواتج بكتيرية اخرى، وان وجود هذه الخلايا مقترن مع الالتهابات المزمنة (Rossol *et al.*, ٢٠٠٥).

كما توافقت هذه النتائج مع ما جاء به فراسنيلي وجماعته حيث بينوا ان هناك ادلة سريرية وتجريبية تشير الى ان وجود الخلايا احادية النواة في تجويف المفصل يعني ان الاستجابة المناعية الذاتية يمكن ان تؤدي الى التهاب مزمن في المفصل (Frasnelli *et al.*, ٢٠٠٥).

٥-١-٢: استخدام تقنيات محورة للتحري عن المسببات المشاركة في خمج المفاصل

جرى استخدام ثلاث تقنيات للتحري عن المسببات المشاركة المحتملة في حالات خمج المفاصل المزمن وتضمنت هذه التقنيات ست هيئات لنتائج التحري عن هذه المسببات المشاركة وكما يلي:-

حالة رقم ١:

وهي المجموعة التي اعطت نتائج زرع ايجابية لجميع التقنيات المستخدمة، اذ ان المسبب المرضي تمكن من النمو على الاوساط الزرعية الشائعة الاستخدام (اكار الدم واكار المكاكونكي)، والاوساط الزرعية الخاصة بعزل المتخفيات (وسط الفارنيت)، فظهور النمو على هذه الاوساط دلالة على ان هناك اشكالاً متعددة من الخلايا البكتيرية (فاقدة الجدار وبكتريا انتقالية (Transitional bacteria)، وذات جدار)، اذ ان ظهورها في تقنية الزرع المتسلسل دلالة على ان المسبب المشارك واقع خارج الخلايا المفصلية او ملتصق على الاغشية الخلوية لها (Sela *et al.*, ٢٠٠٠). اما نمو المسبب المشارك في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور فيعني ان البكتريا فاقدة الجدار كلياً وواقعة داخل الخلايا وهذا يتوافق مع ما جاء به عدد من الباحثين (Schifferli *et al.*, ١٩٨٦; Woody *et al.*, ١٩٨٢; Domingue *et al.*, ١٩٩٧; Domingue & Woody, ١٩٩٧).

حالة رقم ٢:-

وهي المجموعة التي اعطت نتائج ايجابية للزرع بعد تكسير الخلايا وموجبة ايضاً لتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية وهذا يعني ان المسبب البكتيري فاقد الجدار كلياً او في مرحلة الانتقال لنمو جزء منها على الاوساط الروتينية بعد عملية التكسير، اما ظهور النمو في مرحلة التخفيف والمزرعة ثنائية الطور فيعني ان المسبب المرضي فاقد الجدار كلياً وموجود داخل الخلايا (Domingue, ١٩٩٥).

حالة رقم ٣:-

وهي المجموعة التي اعطت نتائج موجبة في تقنية التخفيف والمزرعة ثنائية الطور وهذا يدل ان المسبب البكتيري فاقد الجدار كلياً وموجود داخل الخلايا المفصلية (Synoviocytes) فقط وقد يعود السبب في فقد الجدار الى الظروف البيئية والفسلجية او قد يكون المسبب المرضي طفيلي داخل خلوي فقط وهو من النوع غير الثابت (Domingue & Woody, ١٩٩٧).

حالة رقم ٤:-

وهي المجموعة التي اظهرت نتائج ايجابية للنمو في تقنية الزرع المتسلسل عدا الخطوة الاولى (أي سائل المفصل الكامل)، وموجبة ايضاً في تقنية المزرعة ثنائية الطور وهذا يدل على ان هذه البكتريا على شكلين بعضها فاقد للجدار والاخر انتقالي لنموه على الاوساط الروتينية فضلاً عن الاوساط الخاصة بنمو المتخفيات وقد تكون موجودة خارج الخلايا او ملتصقة على جدرانها (Domingue, ١٩٩٥).

حالة رقم ٥:-

وهي المجموعة التي اظهرت نتائج موجبة الزرع في المراحل الاخيرة من تقنية الزرع المتسلسل وتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور والنمو على اوساط روتينية واوساط خاصة بزرع فاقدة الجدار دليل على ان البكتريا فاقدة كلياً للجدار او في مرحلة انتقالية (Domingue, ١٩٩٥).

حالة رقم ٦:-

وهي المجموعة التي اظهرت نتائج سالبة الزرع في جميع التقنيات الروتينية والتقنيات المحورة في هذه الدراسة وقد يعود السبب الى ما يلي:

١. وجود مناطق تساعد في اختباء او تخفي المايكروب مثل الانسجة تحت المخاطية التي تعد مستودعات مختبئة (Hidden reservoirs) لمسببات خمج المفاصل المزمن (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩).
٢. احتمال ان تكون الاصابة او المرض ناتجاً عن مسبب مرضي يصعب عزله بالطرق المستخدمة في هذه الدراسة كالفيروسات والكلاميديا والركتسيا (Dowling *et al.*, ١٩٩٩).
٣. قد يكون هناك انسداد في الخلايا المفصلية المصابة يؤدي الى منع خروج المسبب المرضي مع سائل المفصل المسحوب من المريض (Rowen *et al.*, ١٩٩٢).
٤. قد تحاط البكتريا المسببة للمرض بالاجسام المضادة (Harada *et al.*, ١٩٩٢).

٥-١-٣: صفات البكتريا فاقدة الجدار الخلوي

من خلال الفحص المجهري لمستعمرات البكتريا فاقدة الجدار الخلوي التي عزلت باستخدام تقنيات زرع محورة في هذه الدراسة كانت ذات اشكال دائرية او بيضوية منتفخة ومتلاحمة بشكل تجمعات خلوية بسبب فقدها للجدار وبعض هذه الاجسام كبير وبعضها صغير وهذا يتفق مع ما جاء به (Domingue *et al.*, ١٩٧٩).

اما بالنسبة لشكل المستعمرات النامية على وسط الفارنيت الصلب فكانت ذات مظهر شبيه بالبيض المقلي (Fried eggs) وهذا يتفق مع ما توصل اليه بعض الباحثين (Panose, ١٩٦٥; Medill Brown *et al.*, ١٩٦٠).

وتمتاز مستعمرة البكتريا فاقدة الجدار بكونها دقيقة وشفافة، بعضها براق عند سقوط الاشعة المائلة عليها. كما تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بامكانية مرورها عبر المرشحات الدقيقة ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر وهي ذات طبيعة مرنة وقابلة للانضغاط وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون في هذا المجال (Zubkov & Shchegolev, ١٩٧٦). كما ان لهذه البكتريا الفاقدة للجدار مقدرة على الارتداد الى الشكل ذي الجدار، وقد تكون ثابتة غير قادرة على الرجوع الى اصلها وهذا يتفق مع Wyric & Rogers (١٩٧٧) .

٥-١-٤: جدوى استخدام تقنيات محورة لعزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من سائل المفصل

من خلال نتائج اختبار Z تبين بأن طريقة المزرعة ثنائية الطور ثم الراسب المكسر واخيراً تقنية التخفيف كانت ذات فروق احصائية معنوية واضحة بالمقارنة مع الطريقة الروتينية لزرع سائل المفصل الكامل وهذا يتوافق مع ما جاء به الناصري (٢٠٠٢) في جدوى هذه الطرق على عينات الادرار من مرضى البيلة المستديمة، ومع ما وجدته السلطاني (٢٠٠٣) بتطبيقها نفس الطرق على الانسمام الدموي من الحمى المعوية، ومع

ما وجده السلطاني (٢٠٠٥) في تطبيقه هذه الطرق على مرضى التهاب الجهاز التنفسي المزمن، وهذه النتائج جميعها تتفق بأن الطرق الروتينية اقل كفاءة في عزل البكتريا فاقدة الجدار من طرق اخرى خاصة بعزل هذه البكتريا وهذا يتفق مع ما جاء به Zhang وجماعته (١٩٩٥).

٥-١-٥: المسببات البكتيرية المشاركة في خمج المفاصل المزمن وعلاقتها بالجنس

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية ان المكورات العنقودية الذهبية فاقدة الجدار قد احتلت المرتبة الاولى من بين العزول البكتيرية الاخرى لخمج المفاصل وهذا يتفق مع ما جاء به العديد من الباحثين (Hultgren *et al.*, ٢٠٠١; Sakiniene & Collins, ٢٠٠٢; Avinash & Abraham, ٢٠٠٤; Zimmermann & Hojr, ٢٠٠٠). وقد يعود السبب في كون المكورات العنقودية الذهبية هي المسبب الاكثر شيوعاً في خمج المفاصل البكتيري الى وجود مستقبلات خاصة لها في انسجة المفاصل وغياب هذه المستقبلات للمكورات العنقودية غير الممرضة (Shirtliff & Mader, ٢٠٠٢). كما ان من الاسباب التي تجعل المكورات العنقودية الذهبية من اهم الممرضات المسببة لخمج المفاصل قد يعود الى امتلاكها لعوامل ضراوة تمكنها من اصابة انسجة المفاصل والعظام، اذ ان متعدد السكريد المحفظي يزيد من ضراوتها بتثبيط عملية البلعمة اذ يعمل على ترسيب C٣b الذي يعطيها خاصية ضد بلعمية، ويعمل حامض التيكويك الشحمي Lipoteichoic acid (LTA) والببتيدوكلايكان على تحفيز افراز الانترلوكين وتنشيط المسلك البديل للمتمم، كما ان البروتينات السطحية للمكورات العنقودية الذهبية تمكنها من الالتصاق بالانسجة واصابتها ويعتبر البروتين المرتبط بالفايبرينوجين احد عوامل الالتصاق. ان تداخل فعل المكورات العنقودية الذهبية مع الخلايا البطانية (Endothelial cells) يحث استجابات مناعية عديدة اهمها الالتصاق المفرط للخلايا احادية النواة (Monocytes) والخلايا الحبيبية (Granulocytes). بينما تداخل المكورات العنقودية مع الخلايا الطلائية (Epithelial cells) يحث تغيرات في التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة (Nair *et al.*, ٢٠٠٠).

اما بالنسبة لاشريكيا القولون فقد تلت المكورات العنقودية الذهبية وبنسبة ١٣.٣% وهذه النسبة جاءت مقاربة لبعض الدراسات في هذا المجال وكما ورد في Keat & McHale (٢٠٠٠). وقد يعود سبب وجود الاشريكيا القولونية في سائل المفصل لبعض المرضى الى كونها هي المسببات الشائعة في اغلب الامراض مثل التهابات المجاري البولية وكما معروف بأن هناك نوع من خمج المفاصل المزمن (المتفاعل) الذي قد يحدث نتيجة لوجود اصابة بكتيرية في موقع اخرى من الجسم مثل التهاب المجاري البولية، التهابات تناسلية، التهاب العيون، التهابات تنفسية، التهاب بطانة الفم وغيرها وقد تشترك الاشريكيا القولونية في احداث هذا الخمج (Toivanen & Toivanen, ١٩٩٩).

وعزلت الكليبسيلا الرئوية بنسبة ١٠% وهذا يتفق جزئياً مع ما جاء به Zimmerman & Hojr (٢٠٠٠). وقد يعود سبب وجودها في سائل المفصل الى اشتراكها مع اخماج اخرى ومن ثم تصل بطريقة او بأخرى الى المفصل وتحدث الاصابة. كما اشارت نتائج الدراسة الحالية ان عزل المكورات المسبحية القيحية كانت اقل نسبة ٣.٣% مقارنة بنتائج بعض من الباحثين (Zimmerman & Hojr,

(٢٠٠٠ اذ اشاروا بأن المكورات المسبحية المرضية تأتي بالمرتبة الثانية بعد المكورات العنقودية الذهبية في احداث الخمج. وقد يعود السبب في وجود المكورات المسبحية في سائل المفصل الى التهابات تنفسية سابقة مثل التهاب اللوزتين او حمى الروماتزم (Congeni *et al.*, ١٩٨٧; Veasy *et al.*, ١٩٨٧; Sakurai, ٢٠٠٣).

كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة عزل بكتريا الخناق هي ٣.٣% وقد جاءت هذه النسبة مقاربة لما جاء به Kaandorp وزملاءه (١٩٩٧). اظهرت الدراسة الحالية ان النساء اكثر عرضة من الرجال لخمج المفاصل وبنسبة ٢/٣ على التوالي وقد اتفقت هذه النتيجة مع بعض الدراسات التي اشارت الى ان النساء المصابات سابقاً بالتهاب المفاصل العظمي للاعمار المتقدمة يكونن اكثر عرضة للاصابة بخمج المفاصل (Cibere, ٢٠٠٠). كما ان نسبة الاصابة بالتهاب المفاصل الرثوي الذي هو احد العوامل الممهدة لخمج المفاصل في النساء اكثر من الرجال (Gupta *et al.*, ٢٠٠١). والسبب في ذلك قد يعود الى عوامل هرمونية او تكاثرية (Toivanen, ٢٠٠٣)، وقد تؤثر الهرمونات الجنسية على المناعة اذ بين Staci وجماعته (٢٠٠١) ان امراض المناعة الذاتية تحدث في النساء اكثر من الرجال.

٥-١-٦: الحساسية الدوائية للبكتريا المسببة لخمج المفاصل

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان بكتريا المكورات العنقودية الذهبية حساسة لكل من المضادات الحياتية الكلورامفنيكول والستربتومايسين والتتراسايكلين وبنسبة ٦٦.٧% لكل منها وذلك لان هذه المضادات تهاجم او تعمل على تثبيط تصنيع البروتين لان البكتريا الفاقدة الجدار لا تمتلك جدار خلوي فتتحسس للمضادات التي تؤثر على تصنيع البروتين، بينما تكون مقاومة للمضادات الحياتية التي تعمل على تثبيط تخليق الجدار الخلوي لانها لا تمتلك جدار خلوي مثل الامبسلين والكلوكاسلين اللذان كانت مقاومة لهما بنسبة ١٠٠%، على الرغم من الاختلافات في الحساسية والمقاومة للمضادات الحياتية من قبل البكتريا الفاقدة للجدار وذات الجدار (Bertolani *et al.*, ١٩٧٥; Domingue *et al.*, ١٩٩٧). الا انه قد يكون هناك تشابه في المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية بين البكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار (Guze *et al.*, ١٩٧٦).

اما بالنسبة لاشريكيا القولون فكانت مقاومة لاغلب المضادات الحياتية وحساسة فقط للناليديكسيك اسد وبنسبة ٧٥% حيث ان هذا المضاد يعمل على اعاقة تصنيع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) في البكتريا السالبة لصبغة غرام، اما بالنسبة للمقاومة للمضادات الحيوية فكانت ولا زالت تشكل العائق الاكبر في علاج اغلب الامراض ولذلك لا بد من تكاثف الجهود العلمية لايجاد مواد مضادة للجراثيم وتعمل على ازالتها (Zhang *et al.*, ١٩٩٥).

٥-٢: الخمج التجريبي للمفاصل

٥-٢-١: تأثير الخمج التجريبي على وزن الارانب

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها عند وزن الحيوانات طيلة فترة تجربة الحقن عبر الوريد والحقن موضعياً بالمفصل كان هناك فقدان ضئيل بالوزن لا يتجاوز ١٠٠ غم (وقريب من فقدان الوزن في حيوان السيطرة) ٤٣ غم في التجربة الاولى بالمقارنة مع الفقدان الكبير يكاد يصل الى ٢٥٠ غم مقارنة بحيوان السيطرة (فقدان الوزن فيه ٥٠ غم) في الوزن بالتجربة الثانية، وان فقدان الوزن بشكل عام هو دليل على الاصابة فالفقدان القليل بالوزن قد يعني ان شدة الاصابة واطئة، اما اذا كان فقدان الوزن كبيراً فهذا يدل على ان شدة الاصابة عالية وقد اشار كثير من الباحثين الى ان فقدان الوزن يتناسب طردياً مع شدة الاصابة للمفصل سواء اكانت بكتيرية او لاسباب اخرى كما جاء في (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨; Hultgren *et al.*, ٢٠٠١; Sakiniene & Collins, ٢٠٠٢; Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣; Campo *et al.*, ٢٠٠٣).

٥-٢-٢: الاعراض المرضية المرافقة لخمج المفاصل التجريبي

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية، تبين ان فقدان الوزن كان اكثر وضوحاً في تجربة الحقن الموضعي بالمفصل وان ذلك يدل على شدة الاصابة في هذه التجربة وقد اشار لعلاقة شدة الاصابة بفقدان الوزن العديد من الباحثين (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨a; Hultgren *et* al., ١٩٩٨b; Hultgren *et al.*, ٢٠٠١; Sakiniene & Collins, ٢٠٠٢; Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣;).

كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم رغبة الحيوان في الاكل والخمول في التجربتين وهذا لربما يعود الى الاصابة البكتيرية، اما تورم المفصل فكان اكثر وضوحاً في تجربة الحقن الموضعي وفي جميع الارانب المخمجة (ما عدا تلك المحقونة بالمكورات العنقودية ذات الجدار والتي اظهرت تأثيراً طفيفاً) مقارنة في تجربة الحقن عبر الوريد وخصوصاً في تلك المحقونة باشريكيا القولون ذات الجدار.

ان ظهور التورم على مفصل ارجل الارانب المخمجة هو احد الادلة على الاصابة بالخمج كما اشار اليه كثير من الباحثين (Hultgren *et al.*,٢٠٠١; Sakiniene & Collins, ٢٠٠٢; Hultgren *et* al., ١٩٩٨; Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣). وقد يعود سبب التورم الى ارتشاح خلايا احادية النواة في فراغ المفصل كما اشار Cambell وجماعته (١٩٩٨).

بينت نتائج الدراسة الحالية الى حدوث وفيات في تجربة الحقن عبر الوريد والحقن الموضعي وبواقع ارنبين في التجربة الاولى وارنب واحد في التجربة الثانية وهذه قد تكون نتائج واردة ضمن ظروف العمل التجريبي كما اشار اليه بعض الباحثين (Hultgren *et al.*, ١٩٩٨; Hultgren & Tarkowski, ٢٠٠١).

بينت النتائج ايضاً وبصورة عامة ان حيوانات التجربة عند الحقن عبر الوريد لم تظهر ظاهرة العرج مقارنة بالحيوانات المحقونة موضعياً، اذ بدى واضحاً العرج في تجربة الحقن الموضعي بمفصل الركبة وهذه الحالة لربما تكون نتيجة منطقية لان الحقن الموضعي يوفر وصول جرع كاملة الى موقع

المفصل مقارنة بالحقن عبر الوريد والذي يضمن انتقال الجرع الى جميع اعضاء الجسم وبضمنها المفاصل وبالتالي تكون الاعراض السريرية متوزعة على جميع انحاء الجسم وبضمنها الاطراف.

٥-٢-٣: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة غرام لسائل المفصل المسحوب من مفاصل الارانب المخمجة تجريبياً

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية بعد سحب سائل المفصل للحيوانات المصابة تجريبياً وفي كلا التجربتين (الحقن عبر الوريد والحقن عبر المفصل) وبعد عمل مسحات لها وتصبيغها بصبغة غرام تم ملاحظة اجسام بكتيرية وحسب النوع البكتيري الذي حقن في الحيوانات سابقاً (مكورات عنقودية ذهبية واشريكيا القولون) ولكلا النوعين الفاقد للجدار وذات الجدار. حيث ان ظهور الاجسام البكتيرية في المسحات المأخوذة في اغلب الحيوانات تقريباً يدل على نجاح تطبيق فرضية كوخ في هذه الدراسة، وان هذه النتيجة توافقت مع ما جاء به العالمان هولتكرين وتاركوسكي (٢٠٠١) اذ وجدا ان بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في تجويف مفاصل الحيوانات المصابة تجريبياً هي بنسبة ٨٠% (Hultgren & Tarkowski, ٢٠٠١).

٥-٢-٤: الفحص المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة ليشمان لرسابة سائل المفصل المسحوب من مفاصل الارانب المخمجة تجريبياً

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة بعد سحب سائل المفصل من الحيوانات وعمل المسحات وتصبيغها بصبغة ليشمان وجد بأن في تجربة الحقن الوريدي كانت الخلايا الالتهابية قليلة وفي جميع المسحات المصبوغة في هذه التجربة وهو يدل على ان شدة الاصابة اقل مقارنة بتلك المأخوذة من الارانب المحقونة موضعياً بالمفصل اذ اظهرت المسحات المصبوغة بصبغة ليشمان احتواءها على خلايا التهابية كثيرة جداً (خلايا وحيدة النواة ومفصصة وخلايا لمفاوية وغيرها) وكانت هذه النتائج متوافقة مع اغلب ما جاءت به الدراسات في هذا المجال، اذ اشار الباحث Deng GM وجماعته (١٩٩٩) الى ارتشاح خلايا التهابية وحيدة النواة ولمفية في حالة حقن الحيوانات المختبرية بالمكورات العنقودية الذهبية او اشريكيا القولون. بينما اشار الباحثان هولتكرين وتاركوسكي (٢٠٠١) الى ازدياد انتاج الخلايا احادية النواة بمقدار اربع مرات في حالة خمج المفاصل البكتيري التجريبي عما في الحالة الطبيعية (Hultgren & Tarkowski, ٢٠٠١). واشار اخرون الى وجود خلايا قيحية(حبيبية او وحيدة النواة) في سائل المفصل لخمج المفاصل التجريبي كما جاء في (Sakurai *et al*;٢٠٠٣;Frasnelli *et al*;٢٠٠٥)

٥-٢-٥: الفحص النسيجي لاغشية المفاصل للارانب المخمجة تجريبياً:

٥-٢-٥-١: الحقن عبر الوريد:

اظهرت نتائج الفحص النسيجي لاغشية مفاصل الارانب المخمجة تجريبياً بخمج المفاصل وذمة بينية خلوية بسيطة في غشاء المفصل للحيوان المحقون بالمكورات العنقودية الذهبية فاقدة الجدار و قد توافقت هذه النتيجة مع ما جاء به Bernetiene وجماعته (٢٠٠٤) وربما يعود وجود الوذمة الى تورم المفصل للحيوانات المخمجة تجريبياً بالمكورات العنقودية الذهبية، بينما تعارضت مع Stanescu (١٩٨٧). اما نسيج غشاء مفصل الحيوانات المحقونة بالمكورات العنقودية الذهبية ذات الجدار فلم يظهر تغير يذكر وهذا قد يدل على ضعف الاصابة واحتمال عدم وصول البكتريا بالتركيز الكافي لاحداث الاصابة. اما بالنسبة للنسيج المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار فقد اظهر حالة نزف واحتقان وعائي واضح داخل الغشاء المفصلي وهذا يتفق مع ما جاء في Bernetiene وجماعته (٢٠٠٤)، بينما النسيج المصاب باشريكيا القولون ذات الجدار لم يظهر تغير واضح بالنسيج وهذا لربما يعود الى عدم وجود اصابة كافية تسبب ضرراً نسيجياً واضحاً.

٥-٢-٥-٢: الحقن الموضعي بالمفصل

اظهرت نتائج الفحص النسيجي للدراسة الحالية بأن النسيج المصاب بالعنقوديات الذهبية الفاقدة للجدار قد اظهرت التهاباً شديداً مع تجمع وارتشاح خلايا التهابية حادة ومزمنة في الغشاء المفصلي مع وجود مناطق متقيحة وهذه النتيجة تتوافق مع ما جاء به Dengوجماعته (١٩٩٩) وبالنسبة لنسيج المفصل المصاب بالمكورات العنقودية الذهبية ذات الجدار فقد اظهر عدم تغير واضح بالنسيج وهذه النتيجة تتوافق مع بقية نتائج التجربة من صبغة غرام وليشمان، واعراض المرض وفقدان الوزن وغيرها من النتائج، واخيراً كان النسيج المصاب باشريكيا القولون فاقدة الجدار وذات الجدار قد اظهر التهاباً شديداً وارتشاح خلايا التهابية (عدلة ووحيدة النواة) في الغشاء المفصلي مع احتقان وعائي وشمول الغضروف بهذا الالتهاب وهذا يدل على شدة الاصابة والتفاعل الالتهابي للمرض في النسيج وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع ما جاء به العديد من الباحثين في هذا المجال (Hultgren *et al.*, ٢٠٠١; Jorgensen *et al.*, ١٩٩٩; Sakurai *et al.*, ٢٠٠٣; Hultgren *et al.*, ١٩٩٨; Compo *et al.*, ٢٠٠٣)، كما اشار هؤلاء الباحثين فضلاً عن حدوث تلك التغيرات اعلاه قد يحدث تحطم للغضروف والعظم في المرحلة المتأخرة لخمج المفاصل التجريبي.

الاستنتاجات Conclusions

١. الاستجابة الخلوية غير المتخصصة ذات سيادة لاحادية النواة في خمج المفاصل البكتيري.
٢. امكانية عزل بكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار من سائل المفصل لمرضى خمج المفاصل باستعمال طرق زرعية محورة.
٣. تقنيتا المزرعة ثنائية الطور والراسب المكسر افضل تقنيات الزرع.

٤. المسببات البكتيرية المعزولة الاكثر شيوعاً في خمج المفاصل هي المكورات العنقودية الذهبية واشريكيا القولون.

التوصيات Recommendations

١. استخدام الاوساط الزرعية الخاصة بفاقدات الجدار (اكار ومرق الفارينت) مع بقية الاوساط الشائعة الاستعمال في الطرق الروتينية.
٢. القيام بدراسة مناعية موضعية لخمج المفاصل المزمن المتسبب عن البكتريا فاقدة الجدار.

جدول (٤-١٣) حساسية البكتريا الموجبة لصبغة كرام الفاقدة للجدار للضادات الميكروبية.

S. aureus (٦)				*S. Pyogenes* (١)				*C.diphtheriae* (١)	
الفاقدة للجدار		ذات الجدار		الفاقدة للجدار		ذات الجدار		ذات الجدار	
R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
٢	٣٣.٣٤	٢	٣٣.٣	٠	٠	١	١٠٠	١	١٠٠
٤	٦٦.٧١	٥	٨٣.٤	١	١٠٠	١	١٠٠	١	١٠٠
٦	١٠٠	٦	١٠٠	١	١٠٠	١	١٠٠	١	١٠٠
٦	١٠٠	٦	١٠٠	١	١٠٠	١	١٠٠	١	١٠٠

١٠٠	١	٠	٠	١٠٠	١	٥٠	٣	٨٣.٤	٥
٠	٠	١٠٠	١	١٠٠	١	٣٣.٣	٢	٣٣.٣٤	٢
١٠٠	١	١٠٠	١	٠	٠	١٠٠	٦	١٠٠	٦
١٠٠	١	٠	٠	١٠٠	١	٥٠	٣	٥	٣
٠	٠	١٠٠	١	٠	٠	٣٣.٣	٢	٣٣.٣٤	٢
٠	٠	١٠٠	٠	١٠٠	١	٦٦.٧	٤	٥٠	٣

جدول (٤-١٤): حساسية البكتريا السالبة لصبغة گرام للمضادات الحيوية.

K.pneumoniae (٣)				*E. coli* (٤)				أقراص المضادات الحياتية
ذات الجدار		الفاقدة للجدار		ذات الجدار		الفاقدة للجدار		
%	R	%	R	%	R	%	R	
٦٦.	٢	٦٦.٧	٢	٥٠	٢	٥٠	٢	كلورامفينكول C٣٠
١٠	٣	١٠٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٤	سيفالوثين CTX٣٠
١٠	٣	١٠٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٤	امبسلين AMP١٠
١٠	٣	١٠٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٤	كلوكساسيلين CX١
١٠	٣	١٠٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٤	ارثرومايسين١٥ E
١٠	٣	١٠٠	٣	٧٥	٣	٧٥	٣	ستربتومايسين S١٠
١٠	٣	٦٦.٧	٢	٧٥	٣	٧٥	٣	ترايميثوبريم TMP٥
١٠	٣	١٠٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٤	ريفامبسين RF٥
١٠	٣	١٠٠	٣	٥٠	٢	٥٠	٢	تتراسايكلين TE٣٠
١٠	٣	٦٦.٧	٢	٢٥	١	٢٥	١	ناليديكسيك اسد NA٣٠

المصادر العربية:

السلطاني، شيماء جاسم (٢٠٠٣). اثر المتخفيات البكتيرية في الحمى المعوية. رسالة ماجستير/ جامعة بابل-كلية العلوم.

السلطاني، ناظم عذاب رباط (٢٠٠٥). الخمج البكتيري المتخفي في التهاب الجهاز التنفسي. رسالة ماجستير جامعة بابل-كلية العلوم.

العاني, فاروق والشبيب, أسفار شهاب (١٩٨٩).المكورات المرضيه الرئيسيه,دار الكتب للطباعه والنشر –جامعة الموصل: ١٠-١١٥.

الناصري، قاسم نجم عبيد (٢٠٠٢): دراسة بايولوجية جراثيم فاقدة الجدار لمرضى البيلة القيحية والبيلة الدموية المستديمة. اطروحة دكتوراه/ جامعة بابل- كلية العلوم.

صالح، ضحى سعد (١٩٩١). علم الاحياء المجهرية، الجزء الاول، الفصل الاول، ص ٢٧.

فيركسوف، جورج أي (١٩٩١). التحليل الاحصائي في التربية وعلم النفس، ترجمة العكيلي، هناء محسن، مطبعة دار الحكمة-بغداد: ٢٣٠-٢٣١.

لطفي، رمسيس والحاج، حميد (١٩٨٤). دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي. الفصل الرابع. ص ١٣٢.

المصادر الاجنبية:

Austin, G.E.(٢٠٠٥). Elimination of Arthritis pain and Inflammation forover Two years with a Single ٩٠ minute, Topical ١٤٪ Gallium Nitrate Treatment: Case reports and review of actions of gallium III. Medical hypothesis. Med. J., ٦٥ (٦): ١١٣٦-١١٤١.

Avinashk, S. & Abraham, G. (٢٠٠٤). Management of Septic Arthritis. Ind. J. Ped., ٧١(٩): ٨١٩-٨٢٤.

Bancroft, J.D. & Stevens, A. (١٩٨٢). Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone N.Y. ١١٧.

Banker, D.D. (١٩٨٠). In: Modern Practice in Immunization, ٣th ed. Banker, D.D. (ed),. Popular prakashan private Ltd., Bomby. P. ١٨٩-١٩١.

Benson, H.J. (١٩٩٨). Microbiology Applications Laboratory Manual General Microbiology. ٧th ed. WCB. McGraw-Hill. P١٥٨-١٦٢.

Bernotiene, E.; Palmer, G.; Talabot-Ayer, D.; Aubert, I. M. & Gabay, G. (٢٠٠٤). Delayed Resolution of Acute Inflammation During Zymosan Arthritis in Leptin-deficient Mice. Arthritis Res. Ther., ٦(٣): ٢٥٦-٢٦٣.

Bertolani, R.; Elberg, S. & Ralston, O. (١٩٧٥). Variations in properties of L-forms of *Pseudomonas aeruginosa*. IAI., ١١(١): ١٨٠-١٩٢.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. & Morses, S.A. (١٩٩٨).; Jawetz, Melnik & Adelberges Medical Microbiology. ٢١ed.Appelton & Lange California. P. ٢٢٦-٢٣٠.

Campbell, L; Rich, M.J.; Biscof, R.J.; Dunn, A.R.; Grail, D. & Hamilton, J.A. (١٩٩٨). Protection from Collagen-induced Arthritis in Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor-deficient Mice. J. Immunol., ١٦١: ٣٦٣٩-٣٦٤٤.

Campo, G.M.; Avenosa, A; Campo, S.; Ferlazzo, A.M.; Altavilla, D. & Calatroni, A. (٢٠٠٣). Efficacy of Treatment with Glycosaminoglycans On Experimental Collagen-induced Arthritis in Rats. Arthritis Research & Therapy, ٥(٣): ١٢٢-١٣١.

Cibere, J. (٢٠٠٠). Acute Mono Arthritis. FMAJ, ١٦٢(١١): ١٥٧٧-١٥٨٣.

Colmegna, I.; Cuchacovich, R. & Espinoza, LR. (٢٠٠٤). HLA-B٢٧-associated Reactive Arthritis: Pathogenetic and Clinical Comsiderations. Clin. Microbiol. Rev., ١٧(٢): ٣٤٨-٣٦٩.

Congeni, B.; Rizzo, C. & Congeni, J. (١٩٨٧). Outbreak of Acute Rheumatic Fever in North East Ohio. J. Pediatr., ١١١: ١٧٦-١٧٩.

Cruickshanik, R.; Duguid, J.P; Marmion, B.P. & Swain, R.H.A. (١٩٧٥). Medical microbiology. Vol. ٢, ١٢th ed. the English language book. Society, London. P.٤٥٩

Darley, E.S.R. & MacGowan, A.(٢٠٠٤). Antibiotic Treatment of Gram Positive Bone and Joint Infections. Journal of antimicrobial Chemotherapy, ٥٣: ٩٢٨-٩٣٥.

Deng, G.M.; Nilsson, I.M.; Verdrengh, M.; Collins, L.V. & Tarkowski, A. (١٩٩٩). Intra-articularly Localized Bacterial DNA Containing GPG motifs Induces Arthritis. Nat. Med., *(٦):* ٧٠٢-٧٠٥.

Doherty, M.; Lauyon, P. & Ralston, S.H. (٢٠٠٢). Musculskeletal Disorders in: Davidsons Principles and Practice of Medicine. ١٩th. Haslett, C.; Chilvers, E.R.; Nicholes, A.; Colledge, N.R. & Huntry, J.A.A. (eds). Churchilli-Livingstone, Edinburgh, London, New York, Philadelphia, ST Lowis, Sydney & Taronto. p ٩٥٧-١٠٤٧.

Domingue, G.J.. & Woody, H.B. (١٩٩٧). Bacterial persistence and expression of disease. Clin. Microbiol. Rev., ١٠ (٢): ٣٢٠-٣٤٤.

Domingue, G.J. (١٩٨٢). Cell Wall Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance p.٤٣٧-٤٣٩.

Domingue, G.J. (١٩٩٥). Electron dense Cytoplasmic Particles Chronic Infection: Bacterial pleomorphyhypothesis Endocytobiosis Cell. Res., ١١ (١): ١٩-٤٠.(Medline Abst.).

Domingue, G.J.; Woody, H.B.; Farris, K.B. & Schlegel, J.U. (١٩٧٩). Bacteria variants In urinary Casts & Renal Epithelial cells. Arch. Intern. Med., ١٣٩: ١٣٥٥-١٣٦٠.

Domingue, G.J; Thomas, R.; Walters, F.; Serrano, A. & Heidger, R.M. (١٩٩٧). Elusive Bacteria in Idiopathic Hematuria. J. Urol.: To be published.

Dowling, J.R.; McCarthy, M.; Riley, D.; Morris, A.J. ١٩٩٩. Med. J., ١١٢(١٠٩٨): ٤١٢. (Medline Abst.)

Egidija & Collins, L. ٢٠٠٢. Combined Antibiotic and Free Radical Trap Treatment is Effective Comating *Staphylococcus aureus* Induced Septic Arthritis. Arth. Res., ٤(٣): ١٩٦-٢٠٠.

Fassbender, H.G. (٢٠٠٤). Latent Bacterial Infection of Joints and Their Clinical Importance. Acta. Clin. Croat., ٤٣(٢): ٧٥-٧٦.

Frank, K.; Hassen, A.D & Patel, R. (٢٠٠٤). CoA is not a Useful Diagnostic Marker for Prosthetic Infection. J. Clin. Microbiol., ٤٢(١٠): ٤٨٤٦-٤٨٤٩.

Frasnelli, M.E.; Taurssio, D, Chobazpeclat, V.; Busso, N. & Alexander, S.O. (٢٠٠٥). TLR٢ Modulates Inflammation in Zymosa-Induced Arthritis in Mice. Arthritis Res. Ther., ٧: ٣٧٠-٣٧٩.

Gardner, P & Provine, H.T. (١٩٧٥). Manual of Acute Bacteria Infections. Early Diagnosis and Treatment,. Little, Brown and company Boston. p. ١٦١-٣٠١.

Gaston, J.S.H. (٢٠٠٠). Immunological Basis of Chlamydia Induced Reactive Arthritis. Sexually Transmitted Infections, ٧٦: ١٥٦-١٦١.

Goldenberg DL.(١٩٩٨).Septic Arthritis (review)Lancet., ٣٥١:١٩٧-٢٠٢.

Goyal, R.; Singh, N.P. & Mathur, M. (٢٠٠٥). Septic Arthritis Due to *Arcanobacterium haemolyticum*. Ind. J. Med. Microbiol., ٢٣(١): ٦٣-٦٥.

Gupta, M.N.; Sturrock, R.D. & Field, M. (٢٠٠١). A prospective ٢-year study of ٧٥ patients with Adult on set Septic Arthritis. Rheumatol, ٤٠(١): ٢٤-٣٠.

Guze, L.B.; Harwick, H.J. & Kalmanson, G.M. (١٩٧٦). *Klebsiella* L.forms Effect of Growth as L-form on Virulence of Reverted *Klebsiella pneumoniae*.J. Infect. Dis., ١٣٣(٣): ٢٤٥-٢٥٢.

Harada, Y.; Deguchi, T.; Kuriyama, M.; Ban, Y. & Kawada, Y. (١٩٩٢). Clinical Evaluation of SD-٨٨٢٨ (antibody coated bacteria assay kit) in Urinary Tract Infection. Kansenshogaku. Zasshi., ٦٦(٩): ١٢٨٣-١٢٨٧. [Medline Abst.]

Huber, W.T. & Brinkley, A.W. (١٩٧٧). Growth of cell wall deficient variants of E.coli comparison of aerobic & anaerobic induction frequencies. J. Clin. Microbiol., ٦(٢): ١٦٦-١٧١.

Hultgren, O.; Eugster, H.-P.; Sedgwick, T.D.; Kamer, H. & Tarkowski, A. (١٩٩٨). TNF/lymphotoxin-α, double-mutan Mice Resist Septic Arthritis but Display Increased Mortality in Response to *Staphylococcus aureus*. J. Immunol., ١٦١: ٥٩٣٧-٥٩٤٢.

Hultgren, O.; Kopf, M. & Tarkowski, A. (١٩٩٨). *Staphylococcus aureus*-Induced Septic Arthritis and Septic Death is Decreased in IL-٤ Deficient mice: Role of IL-٤ as Promoter for Bacterial Growth. J. Immunol., ١٦٠: ٥٠٨٢-٥٠٨٧.

Hultgren, O.; Kopf, M. & Tarkowski, A. (٢٠٠١). Leptin in Septic Arthritis: Decreased Levels During Infection and Amelioration of Disease Activity Upon its Administration. Arthritis Res., ٣(٦): ٣٨٩-٣٩٤.

Hultgren, O.; Stenson, M. & Tarkowski, A. (٢٠٠١). Role of IL-١٢ in *Staphylococcus aureus*. Triggered Arthritis and Sepsis. Arthritis Res., ٣(١): ٤١-٤٧.

Jendro, M.C.; Dentsch, T.; Korber, B.; Kohlur, L.; Kuipers, J.G.; Krausse-Optaz, B.; Westermann, J.; Raum, E. & Zeidler, H. (٢٠٠٠). Infection of Human Monocyte-Derived Monophages with *Chlamydia trachomatis* Induces Apoptosis of T cells: A Potential Mechanism for Persistent Infection.IAI, ٦٨ (١٢): ٦٧٠٤-٦٧١١.

Jin, T.; Bokarewa, M.; Foster, T.; Mitchell, J.; Higgins, J. & Tarkowski, A. (٢٠٠٤). *Staphylococcus aureus* Resist Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism. J. Immunol., ١٧٢: ١١٦٩-١١٧٦.

Jorgensen, C.; Apparailly, F.; Sany, T. (١٩٩٩). Immunological Evaluation of Cytokine and Anticytokine Immunotherapy in vivo: What have we learnt?. Ann. Rheum. Dis., ٥٨: ١٣٦-١٤١.

Kaandorp, C.J.E.; Dinant, H.J.; Laar, M.; Moens, H.J.; Prins, A. & Dijkmens, B.A. (١٩٩٧). Incidence and Sources of Native and Prosthetic Joint Infection: A Community Based Prospective Survey. Ann. Rheum. Dis., ٥٦: ٤٧٠-٤٧٥.

Kempsell, K.E.; Cox, C.J.; Hurle, M.; Wong, A.; Wilkie, S.; Zanders, E.D.; Gaston, J.S.; Crowe, J.S. (٢٠٠٠). Reverse Transcriptase-PCR Analysis of Bacterial rRNA for Detection and Characterization of Bacterial species in Arthritis Synovial Tissue. Infection and Immunity, ٦٨(١٠): ٦٠١٢-٦٠٢٦.

Krijnen, P.; Kaandorp, C.J.E.; Steyerberg, E.W.; Schaardenburg, D.; Moens, H.J. & Habbema, J.D.F. (٢٠٠١). Antibiotic Prophylaxis for Haematogenous Bacterial Arthritis in Patients with Joint Disease: A cost Effectiveness Analysis. Ann. Rheum. Dis., ٦٠: ٣٥٩-٣٦٦.

Lawson, J.W. (١٩٨٢). Induction of the L-form of Bacteria Basic Principles and Clinical Significance, Domingue, G.J. (ed)., Wesley Publishing company, Reading Mass. P. ٧٥-٩٩

Lehtonen, L.; Kortekangas, P.; Oksmon, P.; Eerola, E.; Aro, H. & Toivanen, A. (١٩٩٤). Synovial fluid Muramic Acid inAacute Inflammatory Arthritis. British J. Rheumatol., ٣٣(١٢): ١١٢٧-١١٣٠.

Locht, H. & Krogfelt, K.A. (٢٠٠٢). Comparsion of Rheumatological and Gastrointestinal Symptoms after Infection with *Campylobacter jejuni*, *coli* & enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rheum. Dis., ٦١ (٥): ٤٤٨-٤٥٢.

Macfaddin, J.E. (٢٠٠٠). Individual Biochemical test. In: Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, ٣rd ed, Macfaddin, J.E. (ed).,. Lippincott Williams & Wilkins co., Baltimore, U.S.A. p.٢٧-٤٣٩.

Mangin, M. (٢٠٠٤). Observation of Jarisch-Herxheim Reaction in Sarcoidosis patients. J. Indep. Med. Res., ٢(١): ١-١٣.

Marieb, E.N. (٢٠٠٦). The skeletal system.In:. Essentials of Human Anatomy & Physiology, ٨th ed., p. ١٢٩-٢١٩.

Mclnnes, L.B.; Leung, B.; Wei, X.-Q.; Gemmell, C.C. & Liew, F. (١٩٩٨). Septic Arthritis following *Staphylococcus aureus* Infection in Mice lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. J. Immunol., ١٦٠: ٣٠٨-٣١٥.

Medill-Brown, M.; Hutchinsom, W.G. & Cocklin, E. (١٩٦٠). The L-forms of *Proteus mirabilis*. Ann. Acad. Sci., ٧٩: ٣٧٤-٣٧٩.

Mushtaq, N.; Redpath, M.B.; Luzio, J.P. & Taylor, P. (٢٠٠٤). Prevention and cure of Systemic *Escherichia coli* K١ Infection by Modification of the Bacterial Phenotype. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, ٤٨ (٥): ١٥٠٣-١٥٠٨.

Nair, S.P.; Williams, R.J. & Henderson, B. (٢٠٠٠). Advances in Our Understanding of the Bone and Joint Pathology Caused by *Staphylococcus aureus* Infection. Rheumatol., ٣٩ (٨): ٨٢١-٨٣٤.

Panose, C. (١٩٦٥). Cellular Physiology During Logarithmic Growth of a Streptococcal L-forms. J. Gen. Microbiol., ٣٩: ١٣١-١٣٨.

Peschel, A.; Jack, R. W.; Otto, M.; Collins, L.V.; Staubitz, P.; Nicholson, G.; Kalbacher, H.; Nieuwen, H.; Willem, F.; Jung, G.; Tarkowski, A.; Vankessel, K.M. & Strijpojosa, G.V. (٢٠٠١). *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing Via the Novel Virulence Factor Mp. F. is Based on Modification of Membrane Lipids with L-lysine. J. Exp. Med., ١٩٣(٩): ١٠٦٧-١٠٧٦.

Puliti, M.; Hmolstan, C.; Verwaerde, C.; Bistoni, F.; Orefici, G. & Tissi, L. (٢٠٠٢). Regulatory Role of Interleukin-١٠ in Experimental Group B Streptococcal Arthritis. IAI, ٧٠ (٦): ٢٨٦٢-٢٨٦٨.

Reveille, JD .(٢٠٠٠) .The Changing spectrum of Rheumatic Disease in Human Immunodeficiency Virus Infection (Review) Arthritis.Rheum., ٣٠ :١٤٧-١٦٦.

Roche, F.M.; McChan, M.; Foster, T.J. (٢٠٠٣). The *Staphylococcus aureus* Surface Protein SasG and its Homologones Promote Bacterial Adherence to Human Desquamated Nasal epithelial cells. Microbiology, ١٤٩: ٢٧٥٩-٢٧٦٧.

Rook,G.&Balkwill,F.(١٩٩٨).Cell mediated immune reactions.:Immunology ٥thed Roitt,I.;Brostoff,J.&Male,D.(eds.),.Mosby International Ltd,London. p١٢١-١٣٥.

Rossol, M.; Kaltenhauser, S.; Scholz, R.; Hantzsohel, H. & Hanschildt, S. & Wagner, U. (٢٠٠٥). The Contact-Mediated Response of Peripheral-Blood Monocytes to Preactivated T cells is Suppressed by Serum Factors in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Research & Therapy, ٧(٦): ١١٨٩-١١٩٩.

Rowen, D.; Carn, C.A.; Sonex, C. (١٩٩٢). *Staghorn calculus* presintina as sterile pyuria. Genitourin. Med., ٦٨(٦): ٤٠٣-٤٠٤.

Sakiniene, E. & Collins, L. (٢٠٠٢). Combined Antibiotic and Free Radical Trap Treatment Combating *Staphylococcus aureus* Induced Septic Arthritis. Arthritis Res., ٤(٣): ١٩٦-٢٠٠.

Sakurai, A.; Okahashi, N.; Nakagawa, I.; Kawabata, A.; Atsuo, Ooshima, T. & Hamada, S. (٢٠٠٣). *Streptococcus pyogenes* Infection Induces Septic Arthritis with Increased Production of the Receptor Activator of the NF-KB Ligand. IAI., ٧١(١٠): ٦٠١٩-٦٠٢٦.

Salmi, M.; Rajala, P. & Jalkanen, S. (١٩٩٧). Homing of Mucosal Leukocytes to Joints. J. Clin. Invest., ٩٩(٩): ٢١٦٥-٢١٧٢.

Schifferli, J.A.; Ng., Y.C. & Peters, D.K. (١٩٨٦). The Role of Complementary & its Receptor in the Elimination of Immune Complexes. N. Engl. J. Med., ٣١٥: ٤٨٨-٤٩٥.

Schrijver, I.A.; Melief, M.-J.; Markusse, H.M.; Aelst, I.C.; Opdenakker, G.; Hazenberg, M.P. & Laman, J.D. (٢٠٠١). Peptidoglycan from Sterile Human

Spleen Induces T cell Proliferation and Inflammatory Mediates in Rheumatoid Arthritis Patients and Healthy Subjects. Rheumatol., ٤٠: ٤٣٨-٤٤٦.

Sela, S.; Neeman, R.; Killer, K. & Barzilai, A. (٢٠٠٠). Relationship Between a Symptomatic Carriage of *Streptococcus pyogenes* & the Ability of the Strains to Adhere to & be Internalized by Cultured Epithelial Cells. J. Med. Microbiol., ٤٩: ٤٩٩-٥٠٢.

.

Shirtliff, M.E. & Mader, J. (٢٠٠٢). Acute Septic Arthritis .Clin. Microbiol. Rev., ١٥(٤): ٥٢٧-٥٤٤.

Sibilia, J. & Limbach, F.X. (٢٠٠٢). Reactive Arthritis or Chronic Infectious Arthritis ?. Ann. Rheum. Dis., ١٦: ٥٨٠-٥٨٧.

Staci,D.Bilbo &Randy,J.Nelson (٢٠٠١).Sex Steroid Hormone Enhance Immune Function In Male & Female Siberian Hamsters.AMJ Physiol Regul Integr Comp Physiol ٢٨٠ :٢٠٧-٢١٣.

Stanescu, R.; Lder, O.; Van, E.W.; Holoshitz, J. & Cohen, I.R. (١٩٨٧). Histopathology of Arthritis Induced by Active Immunization to Mycobacterial Antigens or Systemic Transfer of Lymphocyte Lines. A light and Electron Microscopic Study of the Articular Surface using eationized ferritin. Arthritis Rheum., *(٧):* ٧٧٩-٧٩٢.

Stitik, T.; Foye, P.M.; Faaem, F.; Slipman, C.; Talavera, F.; Sacido, R.; Allen, KL. & Campagnoto, DI. (٢٠٠٤). Osteoarthritis. Medicine, Com. Inc.

Stukus, P.E. (١٩٩٧). Investigation microbiology a laboratory Manual for General Microbiology. P-٤٣٩-٤٤٢. Harcourt Brace & Company. P-٤٣٩-٤٤٢.

Svanborg-Eden, C.; Kulhavy, R.; Marlido, S.; Princeos, J. & Mestecky, J. (١٩٨٥). Urinary Immunoglobulins in Healthy Individuals & Children with Acute Pyelonephritis. Scand. J. Immunol., ٢١: ٣٠٥-٣١٣.

Toivanen, P. & Toivanen, A. (١٩٩٩). Two Forms of Reactive Arthritis. Ann. Rheum. Dis., ٥٨: ٧٣٧-٧٤١.

Toivanen, P. (٢٠٠٣). Normal Intestinal Microbiota in the Aetiopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, ٦٢: ٨٠٧-٨١١.

Veasy, L.G.; Wiedmeier, S.E.; Orsmond, G.S. (١٩٨٧). Resurgence of Acute eheumatic Fever in the Intermountain Area of United States. N. Engl. Med., ٣١٦: ٤٢١-٤٢٧.

Waterhouse, J.C. (٢٠٠٤). A new Protocol for Autoimmune Illness, Chronic Fatigue Syndrome, Fibromyalgia and Lyme Disease: Combating Cell Wall Deficient Bacteria and Excessive Inflammation. Marshal Protocol: Conference.

Wilkinson, N.Z.; Kingsley, G.H.; Jones, H.W.; Sieper, J.; Braun, J. & Ward, M.E. (١٩٩٩). The Detection of DNA From a Range of Bacterial Species in the

Joints of patients with a Variety of Arthritis Using a Nested, Broad-range polymerase Chain Reaction. Rheumatology, ٣٨: ٢٦٠-٢٦٦.

Woody, H.B.; Walker, P.D. & Domingue, J.G. (١٩٨٢). Genesis of the urinary oval body by Intracellular Lipid-adsorbing Cell Wall-Deficient Bacteria Basic Principles & Clinical Significance Domingue G. (ed). Addison Wesley Pub. Co. Reacting Mass. P ٢١٩-٢٣٠.

Wucherpfenning, K.W. (٢٠٠١). Mechanisms for the Induction of Autoimmunity by Infectious agents. J. Clin. Invest., ١٠٨(٨) ١٠٩٧-١١٠٤.

Wyric, P.B. & Rogers, H.J. (١٩٧٣). Isolation & Characterization of Cell Wall-Defective Variants of *Bacillus subtilis* & *Bacillus lichniformis*. J. Bacteriol., ١١٦: ٣٣٥-٣٦٢.

Zhang, C.; Pan, Laidzhou, D. (١٩٩٥). Ca Clinical and Experimental Study of L-Form Bacteria in ٦٩٦ cases. Chung-Hya-Nei-Ko-Tsa-Chili, ٣٤(٥): ٣٢٢-٣٢٥.

Zhang, X.; Rimpilainen, M.; Imelyte, E. & Toivanen, P. (٢٠٠١). Enzyme Degredation and Proinflammatory Activity in Erthritogenic and Nonarthritogenic *Eubacterium aerofaciens* Cell Walls. IAI., ٦٩ (١٢): ٧٢٧٧-٧٢٨٤.

Zimmermann, B. & Hojr, G. (٢٠٠٠). Infectious Arthritis and Bursitis. Best Practice of Medicine, ٩(٣): ٧١١-٧٢٧.

Zou, J.; Zhang, V.; Thiel, A.; Rudwaleit, M.; Shi, S.L.; Radbruch, A.; Poole, R.; Braun, J. & Sieper, J. ٢٠٠٣. Predominant Cellular Immune Response to the

Cartilage Auto Antigenic G١ Aggrecan in Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. Rheumatol., ٤٢: ٨٩٦-٨٥٥.

Zubkov, M.N. & Shchegolev, A.G. (١٩٧٦). Comparative Characteristics of Antigenic peculiarities and Several Other properties of stable Long-term Culture of Salmonella L-forms. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., (٣): ٣٨-٤٢.