

التحري عن فايروس التهاب الكبد نمط C بتقنيات الاليزا والريبيا والاستنساخ العكسي والتفاعل التضاعفي لسلاسل الدنا بين مرضى ديلزة الكلية في محافظة نينوى العراق.

باسمة احمد عبدالله⁽¹⁾

محمد دواج خالد المعماري⁽²⁾

محمد نظير معروف⁽³⁾

⁽¹⁾كلية العلوم- جامعة الموصل

⁽²⁾مصرف الدم الرئيس في الموصل- دائرة صحة نينوى

⁽³⁾كلية التربية- جامعة تكريت

الخلاصة:

المقدمة: يعد المرض الصامت (التهاب الكبد الفايروسي نمط C) من المسببات الكبرى لالتهاب الكبد المزمن والتشمع، لذا هدفت الدراسة لتحري عن فايروس التهاب الكبد نمط C بين مرضى الديلزة الدموية والبريتونية في محافظة نينوى/العراق.

المرضى وطرائق العمل: جُمع (80) نموذج دم من مرضى الديلزة 46 (57.5%) ذكوراً و 34 (42.5%) اناثاً والذين تراوحت اعمارهم بين (15-60) سنة بمعدل عمر (37.5%) سنة منهم (50) مريض ديلزة دموية و(30) مريض ديلزة بريتونية و (100) شخصاً من متبرعي الدم الذكور كعينة سيطرة. تم التحري عن الاجسام المضادة للفايروس باستخدام الاليزا الجيل الثالث. واكدت النتائج الموجبة والمشكوك فيها باستخدام تقنية اللطخة المناعية المأشوية الجيل الثالث (الريبيا) واستخدمت تقنية الاستنساخ العكسي والتفاعل التضاعفي لسلاسل الدنا لتوكيد فحوصات Anti-HCV الموجبة والمشكوك فيها.

النتائج: اظهرت الدراسة وجود فروقات معنوية عند ($P \leq 0.05$) بين نسب تواجد الفايروس والاجسام المضادة له في مرضى الديلزة الدموية والبريتونية وعينة السيطرة حيث بلغت (48%) موجب و(48%) سالب و(4%) مشكوك فيها بين مرضى الديلزة الدموية و(2%) موجب و(98%) سالب بين مرضى الديلزة البريتونية و(1%) موجب و(99%) سالب بين متبرعي الدم. واكدت النتائج الموجبة والمشكوك فيها باستخدام تقنية الاليزا الجيل الثالث. واستخدمت تقنية الريبيا حيث اظهرت (44%) موجباً و(52%) سالباً و(4%) مشكوك فيه بين مرضى الديلزة الدموية، (2%) موجباً و(98%) سالباً بين مرضى الديلزة البريتونية و(1%) موجباً و(99%) سالباً بين متبرعي الدم واستخدمت تقنية الاستنساخ العكسي والتفاعل التضاعفي لسلاسل الدنا لتوكيد نتائج الموجبة والمشكوك فيها بتقنية الريبيا. حيث اظهرت (50%) موجباً بين مرضى الديلزة الدموية و(2%) موجباً بين مرضى الديلزة البريتونية و(1%) موجب بين متبرعي الدم.

الاستنتاجات: كان انتشار الاصابة بالتهاب الكبد الفايروسي نمط C عالياً بيم مرضى الديلزة الدموية مقارنة مع مرضى الديلزة البريتونية ومتبرعي الدم.

المقدمة:

ينتمي فيروس التهاب الكبد نمط C إلى عائلة الفايروسات الصفراء Flaviviridae (Bendinelli et al., 2000). وفي سنة 1989 تم كلونة جزء من الحامض النووي للفايروس بتقنية الهندسة الوراثية من قبل الباحث Choo وجماعته 1989 وينتشر عالمياً بمعدل (3%) بين سكان العالم (Theodor and Jamal, 2006)

ينتقل الفايروس عن طريق نقل الدم ومشتقاته الملوثة بالفايروس واستخدام الأدوية عن طرق الوريد (Lauer and walker., 2001). وقد تحدث العدوى خلال عمليات الديليزة الدموية والتنظير الداخلي والعمليات الجراحية والاتصال الجنسي ومن الأم الحامل إلى الجنين والاشترار في استخدام أدوات الحلاقة وفرشاة الأسنان واستخدام أدوات الوشم والمحاقن الطبية غير المعقمة وعن طريق أدوات فحص وقلع الأسنان (CDC, 1999, Zanetti et al., 1998).

ولا تظهر الاعراض المرضية عند معظم المصابين إصابة حادة بالفايروس ، ويحدث الشفاء التلقائي عند (15%) من المصابين إصابة حادة بالفايروس وتتطور (85%) من الحالات الحادة إلى حالة مزمنة. وتتطور الحالة المرضية عند (10 - 20%) من المصابين إصابة مزمنة إلى تشمع الكبد (Cirrhosis) بعد (20-30) سنة من الإصابة ويتطور (1-4%) من حالات التشمع إلى سرطان خلية الكبد Carcinoma Hepatocellular (HCC) (Lauer and walker., 2001).

ويشخص HCV مختبرياً بالتحري عن الأجسام المضادة له بتقنية الاليزا Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Barrera et al., 1995) وتؤكد النتائج الموجبة والمشكوك فيها باستخدام تقنية Recombinant Immunoblot Assay (RIBA). وتستخدم تقنية الـ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) للتحري عن RNA الفايروس (Richter, 2002) ونظراً لقلّة الدراسات في العراق عن انتشار الفايروس وطرق التحري عنه لذا حاولت دراستنا التحري عن الأجسام المضادة لفايروس التهاب الكبد

الفايروس نمط C- عند مرضى الديليزة الدموية ومترعي الدم في مدينة الموصل باستخدام تقنية ELISA HCV 3.0 وتوكيد النتائج الموجبة والمشكوك فيها بتقنية RIBA HCV 3.0 واستخدمت تقنية الـ RT-PCR للتحري عن RNA الفايروس لتوكيد النتائج الموجبة والمشكوك فيها بتقنية الاليزا و RIBA HCV 3.0.

المواد وطرق العمل:

شملت الدراسة الحالية (80) مريض من ديليزة الكلية منهم (50) مريض من الديليزة الدموية و (30) مريض من الديليزة البريتونية ، توزعوا الى (46) ذكوراً و (34) اناثاً والذين تراوحت اعمارهم بين (15-60) سنة ، بمعدل عمر (37.5) سنة وجميعهم من مراجعي مستشفى ابن سينا وحدة ديليزة الكلية و (100) من مترعي الدم الذكور كعينة سيطرة للفترة من حزيران 2005 لغاية اذار 2007.

جمع الدم وفصل المصل وحفظ في (-20) م° لحين الاستخدام.

التحري عن الأجسام المضادة للـ HCV في المصل بتقنية الاليزا الجيل الثالث.

المواد المستخدمة

استخدمت عدة فحص جاهزة من شركة Biokit الاسبانية وتتكون مما يأتي:

- صفيحة من البولي سترين تتكون من 96 حفرة ممدص على سطحها مستضدات عالية النقاوة من بروتينات الفايروس مثل بروتينات اللب والبروتينات غير التركيبية NS3 و NS4 و NS5 .
- محلول مخفف النماذج Sample diluent يتكون من محلول دارى و بروتينات موازنة ومادة حافظة.
- المحلول المقترن بالأنزيم المركز Concentrated Conjugate يتكون من أجسام مضادة للكلوبيولين البشري IgG المحضرة في الارنب والمقترنة بأنزيم البيروكس Rabbit anti-human IgG antibodies

طريقة العمل

- حُضِرَ عدد من الحفر بعدد النماذج المطلوب فحصها مع مراعاة ترك الحفرة الأولى كفاء Blank والحفرة الثانية والثالثة لمحلول السيطرة السالب والحفر الرابعة والخامسة لمحلول السيطرة الموجب.
- أُضيف (200) مايكروليتر من محلول السيطرة السالب للحفرة الثانية والثالثة والثالثة والخامسة و(200) مايكروليتر من محلول السيطرة الموجب للحفرتين الرابعة والخامسة.
- أُضيف (200) مايكروليتر من محلول تخفيف النماذج لكل حفرة ابتداءً من الحفرة السادسة فصاعداً بعدها أُضيف (10) مايكروليتر من المصل ليصبح التخفيف 21/1.
- حضنت الصفيحة لمدة (60) دقيقة في درجة حرارة (37)م.
- غسلت الصفيحة خمس مرات بإضافة (300) مايكروليتر من محلول الغسل المحضر مسبقاً لكل حفرة.
- أُضيف (100) مايكروليتر من محلول المقترن بالأنزيم المخفف لكل حفرة باستثناء الحفرة الأولى.
- حضنت الصفيحة لمدة (30) دقيقة في درجة حرارة (37)م.
- غسلت الصفيحة كما في الخطوة السابقة.
- أُضيف (100) مايكروليتر من محلول المادة الأساس المحضر لكل حفرة.
- حضنت الصفيحة لمدة (30) دقيقة في درجة حرارة الغرفة (20-25)م وفي مكان مظلم.
- أُضيف (100) مايكروليتر من محلول موقف التفاعل لكل حفرة.
- قدرت الكثافة الضوئية عند طول موجي (450) نانوميتر.

conjugated with Peroxidase والذي حُضِرَ

بإضافة (20) مايكروليتر منه إلى (1) سم³ من محلول مخفف المقترن بالأنزيم.

- محلول مخفف المقترن بالأنزيم Conjugate Diluent يتكون من محلول دارئ buffer مع بروتينات مثبتة Protein stabilizer لحفظ الخصائص الكيمياوية والفيزيواوية للمادة وأزيد الصوديوم كمادة حافظة.
- محلول الغسل Washing Solution يتكون من دارئ الفوسفات 1% و Tween 20 و 0.01% ثايومرسال و حُضِرَ بإضافة (100) سم³ منه إلى (900) سم³ ماء مقطر.
- محلول المادة الأساس Substrate Solution يتكون من دارئ سترات- أستيتات المحتوية على بيروكسيد الهيدروجين Citrate acetate buffer containing hydrogen peroxide حُضِرَ بإضافة (20) مايكروليتر من مولد الصبغة إلى (1) سم³ من محلول المادة الأساس.
- مولد الصبغة Chromogen يتكون من TMB .
- محلول السيطرة الموجب Positive Control يتكون من مصل دم إنسان مخفف غير فعال يحتوي على أجسام مضادة للـHCV وأزيد الصوديوم كمادة حافظة.
- محلول سيطرة سالب Negative Control يتكون من مصل دم إنسان مخفف خالي من الأجسام المضادة للـHCV وأزيد الصوديوم كمادة حافظة.
- محلول موقف التفاعل Stop Solution يتكون من حامض الكبريتيك (1) عياري.

الأجهزة والأدوات المستخدمة

- استخدام جهاز الأليزا من نوع Biomaster Jouner من شركة Biokit الأسبانية.
- ماصات دقيقة micropipettes بأحجام مختلفة 10، 100 ، 1000 مايكروليتر.

- سكب المحلول من وعاء الغسل واعيدت العملية ثلاث مرات.
- اضيف (1) سم³ من محلول المقترن بالإنزيم لكل شريط في الوعاء .
- وُضع الوعاء على الهزاز وُرج بسرعة 110 دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق في درجة حرارة الغرفة.
- سُكب محلول المقترن بالإنزيم .
- أُضيف (30) سم³ من دارئ الغسل مع التحريك.
- سُكب دارئ الغسل واعيدت العملية ثلاث مرات .
- أُضيف (1) سم³ من محلول المادة الأساس المحضر مسبقاً لكل شريط في الوعاء وُضع الوعاء على الهزاز وُرج بسرعة 110 دورة/دقيقة لمدة (20) دقيقة في درجة حرارة الغرفة.
- سُكب محلول المادة الأساس.
- أُضيف (60) سم³ من الماء المقطر إلى الوعاء البلاستيكي مع التحريك المستمر .
- سُكب محلول الغسل وأعيدت العملية ثلاث مرات.
- نُقلت الأشرطة بواسطة ملقط إلى ورقة نشاف للتخلص من الماء الزائد.
- تُركت الأشرطة في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة لمدة (30) دقيقة لكي تجف.

النتائج

تفسر النتائج بالاعتماد على مقارنة كثافة حزم المستضد للHCV مع كثافة حزم السيطرة (Level I human IgG & II) كما الجدول (3 و 4)

- محلول السيطرة الموجب يتكون من مصل دم بشري غير فعال يحتوي على anti- HCV و 0.01 % ازيد الصوديوم و 0.05 % سلفات الجنتاماسين كمادة حافظة.
- محلول السيطرة السالب يتكون من مصل دم بشري غير فعال وخال من anti- HCV و 0.01 % ازيد الصوديوم و 0.05 % سلفات الجنتاماسين كمادة حافظة.

الاجهزة والأدوات المستخدمة

- هزاز كهربائي

طريقة العمل

- حُضر عدد الأشرطة بعدد النماذج المراد فحصها مع مراعاة شريط السيطرة السالب والموجب.
- وضعت الأنابيب المحتوية على الأشرطة في حامل الأنابيب الخاص بها ويسجل رقم النموذج والشريط الخاص به على ورقة.
- رُفع غطاء الأنبوب وأضيف (1) سم³ من محلول مخفف النماذج لكل أنبوب.
- أُضيف (20) مايكروليتر من المصل ومحلول السيطرة السالب والموجب لكل أنبوب وبعدها غُليت الأنابيب ووضعت بصورة جيدة.
- وُضع الحامل والأنابيب على هزاز كهربائي وثُبت بشريط مطاطي، وُرج بسرعة (16-20 دورة/ دقيقة) لمدة 4-4.30 ساعة في درجة حرارة الغرفة (20-25) °م.
- رفع غطاء الأنبوب وسحب المحلول.
- وضع (1) سم³ من مخفف النماذج لكل أنبوب .
- اغلق الأنبوب ووضعه في حامل الأنابيب ورج بسرعة 16-20 دورة/دقيقة لمدة 30-35 دقيقة في درجة حرارة الغرفة وبعدها يسحب المحلول من داخله مرة ثانية .
- نقلت الأشرطة إلى وعاء بلاستيكي يحتوي على (30) سم³ من دارئ الغسل المحضر مسبقاً مع التحريك.

- انزيم (RT) Reverse Transcriptase.
- Taq DNA polymerase.
- محلول سيطرة موجب يحتوي على قطعة من DNA حجمها 216 bp.
- زيت معدني mineral oil.

المواد والمحاليل المطلوبة للعمل

- آكاروز خاص لفصل الأحماض النووية Agarose for nucleic acid separation
- محلول الأيتديوم برومايد بتركيز 2.5 ملغم/سم³ وحضر بإذابة 2.5 ملغم من الأيتديوم برومايد في 1(سم³ ماء مقطر
- دارئ (TAE) pH 8.0 Tris-Acetate-EDTA والذي حضر بإضافة 40 ملي مول من Tris acetate و (1) ملي مول من EDTA إلى (1) لتر ماء مقطر ثم أخذ منه (20) سم³ وأضيف إلى (980) سم³ ماء مقطر.
- كلورفورم Chloroform.
- إيثانول 70 % Ethanol.
- أيزوبروبانول Isopropanol.
- محلول تحميل النموذج sample loading يتكون من صبغة البروموفينول الأزرق وكليسرين.

الأجهزة والادوات المستخدمة

- جهاز التضخيم الحراري Thermalcycler من نوع iCycler من شركة BioRad الأمريكية
- جهاز طرد مركزي دقيق مبرد Cold Microcentrifuge تتراوح سرعته بين (12000 - 14000) دورة/دقيقة من شركة eppendorff الألمانية.
- ماصات دقيق بأحجام مختلفة تتراوح بين (0.2- 2 ، 10 ، 20) مايكروليتر.
- سخان كهربائي مغناطيسي.
- حوض ترجيل كهربائي أفتي من نوع Mini-subcell GT من شركة eppendorff الألمانية.

الجدول (3) : تفسير النتائج بالاعتماد على مقارنة كثافة حزم المستضد للـ HCV مع كثافة حزم السيطرة human IgG (Level I &II)

العلامة	كثافة الحزام
-	لا يوجد كثافة
±	أقل كثافة من مستوى حزمة السيطرة للـ IgG الأول
+1	مساوية لكثافة حزمة السيطرة للـ IgG الأول
+2	أكبر كثافة من مستوى حزمة السيطرة للـ IgG الأول وأقل كثافة من مستوى حزمة السيطرة IgG الثاني
+3	مساوية لكثافة مستوى حزمة السيطرة IgG الثاني
+4	أكبر كثافة من مستوى حزمة السيطرة IgG الثاني

الجدول (4) : تفسير النتائج بالاعتماد على نمط حزم المستضد

التفسيرات	نمط حزم المستضد
مالية	لا توجد حزم للـ HCV تمتلك +1 أو أكثر أو امتلاك حزمة hsoD لعلامة +1 أو أكثر كما في الصورة (1.4).
مشكوك فيه	امتلاك أي حزمة مفردة للـ HCV على علامة +1 أو أكثر أو امتلاك حزمة hsoD على علامة +1 أو أكثر مع واحد أو أكثر من حزم HCV التي تملك +1 أو أكثر كما في الصورة (2.4).
موجب	امتلاك اثنين أو أكثر من حزم HCV على علامة +1 أو أكثر كما في الصورة (3.4).

(Ebeling *et. al.*, 1990; Skidmore, 1990)

الكشف النوعي عن HCV RNA بتقنية الاستنساخ العكسي والتفاعل التضاعفي لسلاسل الدنا:

المواد مستخدمة

- استخدمت عدة عمل جاهزة من نوع STRPTM Hepatitis C virus من شركة CinnaGen الأيرانية وتتكون مما يأتي :
- محلول Plus-RNXTM.
- محلول Mix I.
- محلول Mix II.
- Diethyl Poly Carbonate- (DEPC) water treated.

- أهمل الطور المائي وُجف الراسب (RNA) بصورة غير كاملة لمدة 20-30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

- أُضيف 30 µl من DEPC لآذابة RNA

المرحلة الثانية

بناء القطعة المتممة ودورة PCR الأولى

- وُضعت أنابيب RNA المستخلصة في الخطوة السابقة بدرجة حرارة 95 °م لمدة (1) دقيقة وذلك لمسح RNA (Denaturation RNA) وبعدها وُضعت في الثلج.
- عُمّت أنابيب ابندورف جديدة لكل نموذج وكذلك لنموذج السيطرة الموجب والسالب ووضعت في الثلج وأُضيف لكل أنبوب (39) مايكروليتر من Mix I و (1) مايكروليتر من RT enzyme و(0.3) مايكروليتر من Taq DNA polymerase و (5) مايكروليتر من RNA المستخلص لكل أنبوب من انابيب المرضى و (5) مايكروليتر من نموذج السيطرة الموجب DNA positive إلى أنبوب السيطرة الموجب و (5) مايكروليتر من DEPC water إلى انبوب السيطرة السالب و (40) مايكروليتر زيت معدني لكل أنبوب.
- أُغلقَت الأنابيب وُضعت في جهاز الطرد المركزي الدقيق لمدة 2-3 ثانية وذلك لمزج محتوياتها.
- نُقلت الأنابيب إلى جهاز التضخيم الحراري وشُغل حسب البرنامج الآتي:

أعيدت العملية (1) دورة	42 °م	1200 ثانية
	94 °م	120 ثانية
	60 °م	40 ثانية
	72 °م	40 ثانية
أعيدت العملية (20) دورة	93 °م	40 ثانية
	60 °م	40 ثانية
	72 °م	40 ثانية

- مجهز قدرة (50-150) فولت من شركة Bio Rad الأمريكية.

- UV-Transiluminator من شركة Bio Rad الأمريكية.

- كاميرا رقمية Digital camera.

- اسطوانة زجاجية مدرجة.

- تيسات بأحجام مختلفة.

- قناني زجاجية مقاومة للحرارة تستخدم لتحضير الآكاروز

طريقة العمل

المرحلة الأولى

استخلاص الـ RNA RNA Extraction

- أُضيف 450µl من محلول RNXTM-plus في انبوب ابندورف Eppendorf tube وأُضيف إليه 50 µl من المصل مُزج بصورة جيدة وُضن لمدة (10) دقائق في الثلج.
- أُضيف 100 µl من الكلوروفورم ومُزج بصورة جيدة لمدة (3-5) ثواني وفُصل بسرعة 12000g لمدة (5) دقائق.
- نُقل الطور المائي إلى أنبوب ابندورف جديد وأُضيف له حجم مساوٍ (250-300) مايكروليتر من الأيزوبروبانول ومُزج بصورة جيدة وُضن في (20) °م لمدة (20) دقيقة.
- أُجري له طرد مركزي بسرعة 12000g لمدة 15 دقيقة.
- أهمل الطور المائي وأُضيف 200µl من الأيثانول 70% إلى الراسب ومُزج بصورة جيدة، وأُجري له طرد مركزي بسرعة 12000g لمدة (5) دقائق.
- أهمل الطور المائي وُجف الراسب (RNA) بصورة غير كاملة لمدة 20-30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.
- أهمل الطور المائي وأُضيف 200µl من الأيثانول 70% إلى الراسب ومُزج بصورة جيدة، وأُجري له طرد مركزي بسرعة 12000g لمدة (5) دقائق.

دورة PCR الثانية

- علمت أنابيب أبندورف جديدة وأضيف لكل أنبوب (22) مايكروليتر من Mix II و (0.2) مايكروليتر من Taq DNA polymerase و (3) مايكروليتر من نواتج تضخيم الـ PCR الدورة الاولى و (20) مايكروليتر زيت معدني لكل أنبوب.
- نُقلت الأنابيب إلى جهاز التضخيم الحراري وُشغل حسب البرنامج الآتي:

أُعيدت العملية (35) دورة	40 ثانية	93 °م
	40 ثانية	60 °م
	40 ثانية	72 °م

المرحلة الثالثة

الترحيل الكهربائي

حُللت نواتج التضخيم بواسطة الترحيل الكهربائي Electrophoresis كما يأتي:

- أُذيب (3) غرام من الآكاروز في (100) سم³ من TAE وُسخن المحلول حتى أصبح رائقاً ، وتُترك حتى وصلت درجة حرارته (50-60)°م وأضيف له (10) مايكروليتر من محلول صبغة الايتديوم برومايد بتركيز 2.5 ملغم/سم³.
- أُخذ لوح زجاجي وُدُببت فوقه مشط وكانت المسافة بين اللوح والمشط حوالي (0.2) سم³ وذلك لعمل حفر في الآكاروز.
- صُب الآكاروز فوق اللوح وتُترك ليتصلب وبعدها أُزيل المشط برفق حتى لا يتحطم الآكاروز.
- نُقل الآكاروز إلى حوض الترحيل الكهربائي.
- غُر الآكاروز بمحلول TAE وكان حجم المحلول (2-1) سم³ فوق سطح الآكاروز.

- مزج (10) مايكروليتر من نواتج تضخيم PCR الدورة الثانية مع (2) مايكروليتر من محلول تحميل النموذج ووضعت في الحفرة الخاصة لكل نموذج.
- مُرر تيار كهربائي بقوة (100) فولت، (120) ملي أمبير لمدة (45) دقيقة، مع مراقبة حركة صبغة البروموفينول الأزرق حيث قُطع التيار الكهربائي عندما وصلت الصبغة إلى حافة طبقة الآكاروز.
- نُقل الآكاروز وُضع تحت UV-Transilluminator لملاحظة حزم نواتج التضخيم.
- أُخذت صورة للحزم بواسطة كاميرا رقمية Digital Camera كما في الصورة (1).

النتائج

تم مقارنة حجم حزم العينات المفصولة مع حجم حزم عينات السيطرة السالبة والموجبة وفُسرت النتائج كالآتي:

التفسيرات	النتائج
العينة سالبة للـ HCV	لا توجد حزم حجمها 216 bp
العينة موجبة للـ HCV	وجود حزم حجمها 216 bp

(Weiner et. al., 1995)

التحليل الاحصائي:

- استخدام اختبار Fisher Freeman Halton لإيجاد الفروقات بين مجاميع الاختطار (Landis & Koch, 1997).
- وقد عدت النتائج معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 أو أقل.

النتائج والمناقشة:

الفحوصات المناعية بتقنيتي RIBA & ELISA

يتحرى مبدئياً عن Anti-HCV باستخدام تقنية الاليزا ويعد النموذج متفاعل اذا كانت قراءة كثافته الضوئية اكبر من الحد الفاصل (0.358) عند طول موجي (450) نانوميتر ويعد فحص

اما النتائج المشكوك فيها بتقنية RIBA فيعاد توكيدها باستخدام فحوصات الاحماض النووية (NAT) Nucleic Acid (NIH2002;CDC,2003; kim *et.al.*, 2005), Tests . وقد كانت نتائج الفحوصات التوكيدية في مرضى الديلزة البريتونية ومتبرعي الدم مطابقة لنتائج الفحوصات بتقنية الاليزا.

جدول (5) النسب المئوية لنتائج فحوصات Anti-HCV بتقنيتي RIBA & ELISA HCV 3.0

المجاميع	النسب المئوية لنتائج فحوصات Anti-HCV بتقنية RIBA HCV 3.0			النسب المئوية لنتائج فحوصات Anti-HCV بتقنية ELISA HCV 3.0		
	مشكوك فيه	سالب	موجب	مشكوك فيه	سالب	موجب
ديلزة الكلية	4%	52%	44%	4%	48%	48%
ديلزة بريتونية	1%	98%	1%	1%	98%	1%
متبرعو الدم	1%	99%	1%	1%	99%	1%

فحوصات التحري عن HCV RNA بتقنية RT-PCR

استخدمت تقنية RT-PCR كما في الصورة (1) في الكشف عن RNA الفايروس لتوكيد النتائج الموجبة والمشكوك فيها بتقنية RIBA HCV 3.0، حيث ظهر (4%) من النتائج المشكوك فيها بتقنية RIBA بانها موجبة بعد توكيدها بتقنية RT-PCR وهذه دليل على وجود تضاعف نشط للفايروس اما حالة كون نتيجة فحص Anti-HCV مشكوك فيه فهذه الحالة تحدث عندما يكون هناك بداية اصابة أي خلال فترة التحول المصلي او تحدث في الاشخاص المصابين اصابة مزمنة بـ HCV لذلك يجب الاهتمام الى النتائج المشكوك فيها بتقنية RIBA وعدم اعتبارها سالبة، واعادة توكيدها بتقنية NAT وذا لم تتوفر هذه الفحوصات يتم اعادة الفحص بعد 6 اشهر من تاريخ اول فحص
Thomas *et. al.*, 2000; Tobler *et.al.*, 2001; O'Grady *et. al.*, 2000).

النموذج المتفاعل بصورة زوجية، فاذا كانت قراءة احد النتائج الزوجية متفاعلة يعد النموذج متفاعل ويعطي قيمة موجبة اما اذا كانت قراءة كثافته الضوئية مساوية للحد الفاصل فالنموذج يعد مشكوك فيه، ويعاد توكيد النتائج الموجبة والمشكوك فيها باستخدام تقنية RIBA (CDC,2003). ويظهر الجدول (5) النسب المئوية لنتائج فحوصات Anti-HCV باستخدام تقنيتي ELISA و RIBA حيث كانت النسب المئوية لنتائج فحوصات anti-HCV بتقنية ELISA (48%) موجب و (48%) سالب و (4%) مشكوك فيه بين مرضى الديلزة الدموية و (2%) موجب و (98%) سالب بين مرضى الديلزة البريتونية، (1%) موجب و (99%) سالب بين متبرعي الدم، بينما ظهرت النسب المئوية لنتائج فحوصات Anti-HCV بعد توكيدها بتقنية RIBA HCV 3.0، (44%) موجب، (52%) سالب و (4%) مشكوك فيه بين مرضى ديلزة الكلية و (2%) موجب و (98%) سالب بين مرضى الديلزة البريتونية و (1%) موجب، (99%) بين متبرعي الدم.

ومن هنا نستنتج بالرغم من الخصوصية العالية لتقنية ELISA HCV 3.0 التي تصل الى اكثر من (99%) الا ان هذه النسبة من الخصوصية لا تبرهن التنبأ المطلوب عن مستوى ايجابية الفحص وذلك لان نسبة الفحوصات الموجبة بين مرضى الديلزة الدموية بتقنية الاليزا كانت (48%) قد انخفضت الى (44%) بعد توكيدها بتقنية RIBA HCV 3.0 ومن هذا يتضح وجود (4%) نتائج موجبة كاذبة (False Positive) والتي تحدث ربما بسبب وجود اجسام مضادة ذاتية او وجود عامل الروماتيزم (Rheumatoid Factor) او وجود مستوى عالي من الكلوبولينات المناعية (Tobler *et. al.*, 2001) وعلى الرغم من الخصوصية العالية لتقنية RIBA الا انها لا تفرق بين الاصابة القديمة والحديثة ولكن توكيد النتائج الموجبة للـ Anti-HCV يعطي مؤشر جيد للحاجة الى استشارة طبية (CDC,1998;Busch *et. al.*, 2000).

خلال عمليات الدليزة الدموية. وان نسبة تواجد الفايروس HCV في مرضى الدليزة الدموية في دراستنا هي اقل من نسبة تواجد Anti-HCV بين مرضى الدليزة الدموية في المملكة العربية السعودية حيث بلغ تواجد Anti-HCV (72%). (Shaheen et.al. , 2005).

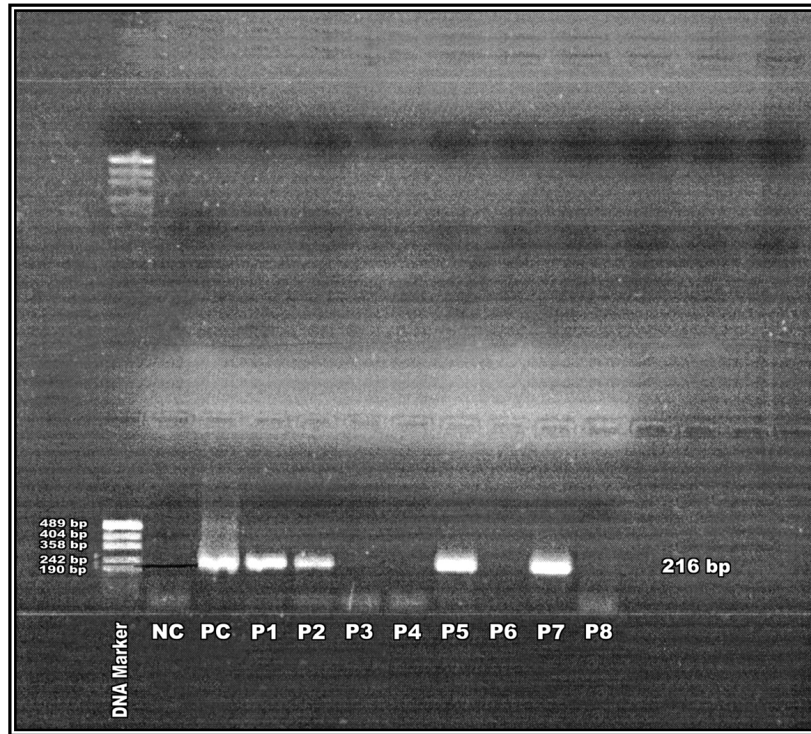
ومن هذا يتضح بان نسبة تواجد HCV بين مرضى الدليزة الدموية في مدينة الموصل اقل من نسبة تواجده بين مرضى الدليزة الدموية في المملكة العربية السعودية ومقارنة لنتائج الدراسة التي اجراها الباحث Mendez-Sanches et al,2004 حول انتشار Anti-HCV في مرضى الدليزة الدموية في الولايات المتحدة الاميريكية، والبالغة 48%.

جدول (6) مقارنة بين النسب المئوية لتواجد فايروس HCV بين مرضى الدليزة الدموية والبريتونية ومترعي الدم عند فحصها بتقنية الـ RT-PCR.

النسب المئوية لتواجد الفايروس HCV	المجاميع
50%	مرضى الدليزة الكلية
2%	مرضى الدليزة البريتونية
1%	مترعي الدم

اظهر الجدول (6) مقارنة بين النسب المئوية لتواجد الفايروس HCV بين مرضى الدليزة الدموية والبريتونية ومترعي الدم , حيث بلغ تواجده (50%) بين مرضى الدليزة الدموية و (2%) بين مرضى الدليزة البريتونية و (1%) بين مترعي الدم . ومن هذا يتضح بوجود فرق معنوي بين مستوى تواجد الفايروس HCV بين مرضى الدليزة الدموية والبريتونية ومترعي الدم عند مستوى (P≤0.05) وهذا ربما يعود الى عمليات نقل الدم الملوث بالفايروس اما نتيجة عدم توفر مواد الفحص الفايروسي في مصرف الدم نتيجة الظروف التي مر بها العراق او جمع الدم من اشخاص مصابين اصابة حديثة بالفايروس حيث لا يمكن الكشف عن الاجسام المضادة للفايروس في مصولهم خلال فترة التحول المصلي وهي الفترة بين دخول الفايروس الى الجسم وظهور الاجسام المضادة لــــه وقد يتاخر التحول المصلي في بعض الاشخاص لاكثر من سنة (Ridzon et. al.,1997;;Bux-Gewehr et. al., 2002; Bendinelli et. a.l .,2000 Sherlock & Dooly,2002) او نتيجة تلوث مكائن الدليزة بالفايروس وعدم كفاية تعقيم وتطهير الادوات والمكائن المستخدمة او الى تلوث المحيط بالفايروس او العدوى من مريض الى اخر نتيجة وجودهم في نفس المكان وقرب الاسرة من بعضها البعض او الى العلاج او استخدام نفس المحاقن الطبية بين مرضى او نتيجة استخدام الادوية الكابحة للمناعة او الى احتمال عملية نقل كلية من شخص مصاب بالفايروس او الى احتمالية حدوث عدوى للمرضى من قبل الكادر الصحي في وحدات الدليزة الدموية (Yerly et. al. , 2001; Delarocque-Astagnead et. al. , 2002 ; Rao et al ,2002; Abacioglu et al , 2003 ; Zampieron et .al., 2004; Diordjevic et.al. , 2005 Allander et.al. , 2006).

اما نسبة الاختلاف في نسبة تواجد HCV بين مرضى الدليزة الدموية والبريتونية فرمما يعود الى عدم استخدام مكائن الدليزة في مرضى الدليزة البريتونية حيث تكون مكائن الدليزة الدموية اكبر مصدر للاصابة بالفايروس وكذلك الى قلة عمليات نقل الدم فيهم مقارنة مع عمليات نقل الدم مع مرضى الدليزة الدموية الذي يخضع اكثر من (98%) منهم الى عمليات نقل الدم



الصورة (1): نتائج تضخيم الـ PCR

transfusion hepatitis by a third- generation ELISA. Vox Sang, 86: 15-18.

Bendinelli M, Pistello M, Maggi F & vatteroni M 2000 Blood- borne hepatitis viruses: hepatitis B, C, D, and G viruses & TT viruses. Clinical Virology Manual, 3rd edition, P. 366-367.

Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Straner SL, Hewlett I & Preston S (2000) Nucleic amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infection disease: report of the enteroragnizational Task force of Nucleic acid Amplification of Blood donors. Transfusion, 40: 143-59.

Bux-Gewhr I, Schmandt S, Zot RB & Scharf RE 2002 Long Term hepatitis C seroconversion in blood donors. Transfusion, 20: 17-35.

Center for Disease control and prevention 1998 Recommendations for prevention of hepatitis C virus infection and HCV related chronic disease, MMWR, 47: 1-39.

توضح الصورة (1) نتائج فحوصات الكشف النوعي عن

RNA الفايروس حيث يشير DNA Marker إلى قطع DNA مختلفة الاوزان الجزيئية و NC إلى نموذج السيطرة السالب و PC إلى نموذج السيطرة الموجب و P1,2,3,4,5,6,7,8 إلى أرقام نماذج المرضى واعتبرت النتيجة موجبة للحزمة التي وزنها الجزيئي 216 زوج قاعدة نتروجينية.

المصادر:

Abacioglu Y H, Bacaksiz F, Bahar H I & Simmonds P C 2003 Molecular evidence of nosocomial transmission of hepatitis C virus in a haemodialysis unit. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 10: 182-186.

Allander T, Medin C, Jacobson SH, Grillner L & Persson MA 2006 Transmission of hepatitis C virus by Transfer an infected individual to anew dialysis unit. Nephron, 73: 110.

Barrera JM, Francis B, Ercillagnelles M & Lee R 1995 Improved detection of anti- HCV in post

- for association of hepatitis C infection with parenteral schistosomiasis treatment in Egypt. *BMC infect. Dis.*, 2 : 29-30.
- Richter SS 2002 Laboratory Assay for Diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Journal of clinical Microbiology*, 40: 4407-12.
- Ridzon R, Gallagher K, & Ciesielskic 1997 Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needle stick injury. *N Engl J. Med.*, 336: 919-22.
- Shaheen F A, Huraib SO & Al-Rasheed R (2005) prevalence of hepatitis C antibodies among hemodialysis patients the western province of Saudia Arabia T kidney Dis-Trans plant – 6: 136-9
- Sherlock S & Dooley J 2002 Disease of the liver and biliary system. Black well publishing company, 11th edition, 305-316.
- Skidmore SC (1990) Recombinant immunoblot assay for hepatitis C antibody. *Lancet*, 336-363.
- Theodor SY & Jamal MM 2006 Epidemiology of hepatitis C virus infection. *International journal of Medical science*, 3 (2): 4-46 <http://www.Medsci.org> .
- Thomas DL, Astem Borski J, Rai RM & et al 2000 Natural history of hepatitis C virus infection , host, viral and environmental factor. *J. AMA*, 184: 450-456.
- Tobler LH, Stramer SL & Kleinman SH 2001 Misclassification of HCV- Viremic blood donor as indterminat by RIBA 3.0 because human superoxide dismutase reactivity. *Transfusion*, 41: 1625-1626.
- Weiner A, Erickson AI, Kansopon J & walker CM (1995) persistent hepatitis C virus infection in chimpanzee is associated with emergence of cytotoxic T lymphocyte escape variant- proc- Nalt –Acad- Sci USA, 92, 2755-2759.
- Wilbus JC (1993) Development and use of laboratory tests for hepatitis C infection *J. Clin. Immonassay*, 16 : 20-207.
- Center for Disease control and prevention 2003 Guidelines for Laboratory testing and Result Reporting of antibody to hepatitis C virus. *Morbidity & Mortality weekly report*, Vol. (52) No (RR3) P.3.
- Choo QL, Kuo G & Weiner, AJ 1989 Isolation of a c DNA clone derived from a blood-borne non-A non-B hepatitis genome. *Science*, 244: 359-62.
- Delarocque- Astagnead E, Baffoy N, Thiers V, & Simon N 2002 Outbreak of hepatitis C virus infection ia hemodialysis unit: potential transmission by the hemodialysis machine? *Infect. Control. Hosp. Epidemol.*, 23: 328-334.
- Diordjevic V, Stojanovic K & Stefanoric V 2005 Prevention of nosocomial transmission of hepatitis C infection in hemodialysis unit. A prospective Study. *Int. J. Artif- Organ*, 23: 181-188.
- Ebeling F, Naukarinen R & Leikola A (1990) Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as a predictor of infectivity. *Lancet*, 335 : 982-983.
- Kim JL, Morgens Tern KA, Lin C, Fox T & Dwyer MD 2005 Crystal structure of hepatitis C virus NS3 Protease domain complex with a synthetic NS4A cofactor Peptide. *Cell*, 87: 343-355.
- Lands JR & Koch CG (1997). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33 : 159-174. Lauer GN & Walker BD 2001 Hepatitis C infection. *N Engl J. Med.*, 345: 41-52.
- Mendez-Sanchez N, Motolakuba D, Chareztapice NC (2004) preratence of hepatitis C virns infection among hemodialysis patients atatertiary-car hospital in mexico city. *Tournal of clinocal mrobiology*, 42: 4321-4322.
- National Institiutes of Health 2002 NIH consensus statement on management of hepatitis C: consens state. *State sci statements*, 19 (3): 1-46.
- O'Grady JG, Lake JR & Howdle PD 2000 *Comprehensive clinical Hepatology*. Harcourt publishers limited, PP. 16.1-16.13.
- Rao MR, Naficy AB, Darwish MA, Schisterman J. Clemens DJ & Edelman R 2002 further evidence

- management of HCV in haemodialysis population part 1: center policy. EDTNA ERCA. J. 30.
- Zanetti AR Tanzi E Newell ML 1999 Mother to infant transmission of hepatitis C virus. J Hepatol, 31: 96-100.
- Yerly S, Quadri R, Neyro F, Barbe KP & Perrin L 2001 Nosocomial outbreak of multiple blood-borne viral infection. J. Infect. Dis., 184: 369-372.
- Zampieron A L, Jayasekera H, Elseviers M & Lindley E 2004 European study on epidemiology and the

Detection of Hepatitis C Virus (HCV) by ELISA, RIBA and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique among Kidney dialysis patients in Nineveh Governorate/Iraq.

Basima A. Abdullah ⁽¹⁾ Mohammed D. Khaled ⁽²⁾ Mohammed Nather Maarouf ⁽³⁾

⁽¹⁾ Dept. of Biology - College of Science - University of Mosul

⁽²⁾ Mosul Central Blood Bank - Nineveh Health Directorate

⁽³⁾ College of Education - University of Tikrit

Abstract:

Introduction: the silent disease (Hepatitis C virus) is considered as one of the major causes of chronic hepatitis and cirrhosis, hence the aims of study to detect Hepatitis C virus among hemodialysis and peritoneal dialysis in Nineveh Governorate/Iraq.

Patients and Methods: (80) blood samples were collected from dialysis patients 46 (57.5%) males, (42.5%) females at age (15-60) years, the average age (37.5) years, include (50) hemodialysis patients, (30) peritoneal patients and (100) person from health blood donors as a control group.

We used ELISA version 3.0 to detect anti-HCV and confirm the positive and equivocal results by Recombinant Immunoblot Assay version 3.0 (RIBA HCV 3.0), and used Reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction (RT-PCR) to confirm positive and equivocal results by RIBA technique.

Results: the current study showed significant differences ($P \leq 0.05$) between percentage of anti-HCV and HCV RNA between hemodialysis, peritoneal dialysis and control group. The percentage of anti-HCV when tested by ELISA in serum of hemodialysis patients was (48%) positive, (48%) negative, (4%) equivocal, while (2%) positive (98%) in serum of peritoneal dialysis, (1%) positive, (99%) negative in control group. We used RIBA technique to confirm positive and equivocal results in ELISA the results showed (44%) positive, (52%) negative and (4%) equivocal between hemodialysis patients, (2%) positive, (98%) negative between peritoneal dialysis, while showed (1%) positive, (99%) between control group.

We used (RT-PCR) to confirm positive and equivocal results in RIBA technique; it showed (50%) positive between hemodialysis patients, (2%) positive in peritoneal dialysis, (1%) positive in control group.

Conclusion: the prevalence of Hepatitis C virus was higher in Hemodialysis than peritoneal dialysis in Nineveh Governorate/Iraq.