التحري عن أضداد لب الفيروس (Core IgM, Core IgG) لمرضى التهاب الكبد الفيروسي البائي

د. عباس عبود فرحان **د. محمد عبد الدايم صالح** *** مروج علي فهد الراوي**

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى كلية العلوم – جامعة ديالى كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

الخلاصة

يتميز التهاب الكبد الفيروسي بقابليته الوبائية على إصابة العديد من أفراد المجتمع وهو احد المشاكل الصحية في جميع أنحاء العالم ولاسيما الدول النامية ويقصد بمصطلح التهاب الكبد الفيروسي الأنواع الخمسة الرئيسة والمسماة حسب اكتشافها (A,B,C,D,E) فضلاً عن النوعين الآخرين G وهو اقل أهمية وF المكتشف حديثاً والذي لا يعرف مدى تأثيره في الإنسان، شملت الدراسة على(١٠٣) شخص مصاب بالتهاب الكبد الفيروسي ب و(٤٠) شخص غير مصابين (مجموعة سيطرة) من عدة مستشفيات تضمنت (المركز الوطني لنقل الدم ، مستشفى الشهيد غازي الحريري و مستشفى بغداد التعليمي) في محافظة بغداد للفترة الممتدة من منتصف شهر آب ٢٠١٢/٨/١٥ ولغاية منتصف شهر كانون الأول١٥/١٢/٢٠١٢ وبأعمار متفاوتة ضمن مدى عمري يتراوح بين (٢٠-٦٠) سنة. سجلت الدراسة انتشار أضداد لب الفيروس (Core- IgG) لدى المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي البائي وأظهرت ٥٤ (52.4%) شخص موجبين دالاً على وجود إصابة قديمة بينما أظهر الكشف عن أضداد لب الفيروس (Core- IgM) وجود ٢٩ (28.2%) شخص موجبين دالاً على وجود إصابة حديثة .

الكلمات الدالة : التهاب الكبد الفيروسي البائي ، لب الفيروس IgG ،لب الفيروس IgM

Investigating of the core antigen of the virus (Core IgM, Core IgG) to patients with viral hepatitis B

Dr. Abbas Abood Farhan **Dr. Mohammed Abdul-Daim Saleh** **Morooj Ali Fahd Al-Rawi**

College of Education for pure science –Diyala University **College of Science- Diyala University** **College of Education for pure science –Diyala University**

Received 2 May 2013 ; Accepted 29 September 2013

Abstract

Viral hepatitis is the most common epidemic disease worldwide . It is one of the serious health problems which spreading all over the world ,especially in the developing countries such as Iraq. Viral hepatitis including the five main types symbolized with (A,B,C,D, and E) according to their discovering dates . Moreover , there are other two types such as G and F ,both are less important and no more detailed information about their effects on human health.The study samples included 103 individuals infected with viral hepatitis B, and the control group was 40 uninfected individuals. The samples were collected during December 15 – August 15 from different medical sites (National Center for Blood Transfusion, Hospitals AL-Shaheed Ghazi AL -Hariri and Baghdad Teaching Hospital) all located in Baghdad ,Iraq .The ages of sample individuals were varying (20-60) years. Regarding the

spread of viral core (core-IgG) of viral hepatitis B, the results showed that 54 individuals (52.4%) were positive indicating past infection whereas . the(core-IgM) test showed that 29 individuals (28.2%) were indicating recent or continuing infecation.

Key words : hepatitis viral B, core-IgG, core-IgM

المقدمة

كان فيروس HBV في عام ١٩٩٠ يقتل الألوف سنوياً، وحالياً الملايين حول العالم حاملين للمرض وبشكل مزمن ولهم القابلية على إصابة أفراد آخرين وقسم كبير منهم يتحول عندهم الإصابة بالفيروس إلى تليف الكبد أو سرطان الكبد Hou (*et al.*,2005) . يشكل فيروس التهاب الكبد نوع B أولويات البرامج الصحية في العالم ويحضى باهتمام واسع من جميع السلطات الطبية ، فبحدود ٣٥٠ مليون إصابة مزمنة حسب إحصائية منظمة الصحة العالمية و ٨٠٠ ألف وفاة سنويا (Raimondo وآخرون،٢٠٠٨) . سجل في استراليا في سنة ٢٠١٠ نحو ١٧٠ ٠٠٠ إصابة بفيروس التهاب الكبد HBV ونحو ٣٣٥ وفاة (CDC, The Kirby Institute,2011). هذا وقد بينت الدراسات التي أجريت في مختلف دول العالم أن التهاب الكبد نوع B يشكل 20-25% من حالات التهاب الكبد الفيروسي الحادة التي يصاحبها اليرقان وان معظم الإصابات تحدث لدى اليافعين والبالغين بعمر(١٥-٥٤) سنة ويسبب فيروس التهاب الكبد نوع B إصابة مزمنة اقل من٥% للبالغين (Guha *et al.*,2004) . ينتشر HBV خلال الالتماس مع سوائل الشخص المصاب إذ يعد الدم ومنتجاته المسبب الرئيس لانتشار أمراض الكبد المزمنة وايضاً اللعاب ،السائل المنوي و ينتقل من الأم الى الطفل أو بالاتصال الجنسي (Aljooanin وآخرون،٢٠١٢) .

يظهر المستضد HBs Ag في الإصابة الحادة acute أو المزمنة chronic بالفيروس بعد حوالي ٤-٦ أشهر وتستمر لسنوات أو ربما مدى الحياة ، تشير الأجسام المضادة Anti-HBs على الحماية المناعية (Almeida,2011) . يظهر HBs Agفي المرضى قبل ظهور أعراض مرض hepatitis أو انه يرتفع في المصل الحاوي على (ALT) ، أن وجود Anti-HBs ضد المستضد HBs Ag دلالة على الاستجابة المناعية للفيروس Immunity to HBV أو دلالة على الإصابة القديمة أو التحصين vaccinatetion (Lin and Kirchner, 2004) .

يوجد مستضد اللب HBc- Ag في خلايا الكبد المصابة hepatocytes فقط ولا يوجد في المصل إذ يمكن التحري عنه ولا يعد كعلامة مصلية HBV markers antibodies ، لكن الأجسام المضادة تظهر في بداية المرض ، يظهر IgM الذي يشير الى إصابة حديثة أو حادة خلال ٦ أشهر من الإصابة ، أما IgG يظهر متأخرا إذ يشير الى إصابة قديمة أو مزمنة (Almeida,2011) و (Lin and Kirchner, 2004) .

أن Anti-HBc هو أول الأجسام المضادة التي تظهر والتي تشير الى إصابة حديثة أو سابقة، Anti-HBc IgM ويوجد بمعدل مرتفع خلال الإصابة الحادة وضمن ستة أشهر الأولى ثم يبدأ بالتلاشي على الرغم من استمراره في بعض الحالات مع الإصابة المزمنة أما Anti- HBc IgG يوجد في الإصابات السابقة ويبقى لمدى الحياة (Almeida,2011) . يكون خلال الإصابة الحادة صنف IgM هو السائد وهذا يساعد في تشخيص المرض مع وجود HBsAg positive في مصل المرضى الذي قد يتفاقم الى الحالة المزمنة (Liang ,2009) .لذلك تهدف الدراسة الى التحري عن بعض الواسمات الفيروسية (core IgM ,core IgG) المتعلقة بالإصابة المزمنة والحادة .

المواد وطرائق العمل

جمع النماذج

تم جمع ١٠٣ عينة من مرضى مصابين بالتهاب الكبد الفيروسي نمط B من منتصف شهر أب ولغاية منتصف شهر كانون الأول ٢٠١٢ وتضمنت عينات الدراسة ٦٦ من الذكور و37 من الإناث ضمن مدى عمري يتراوح بين (٢٠-٦٠) سنة ، ومجموعة سيطرة تكونت من ٤٠ شخص ٢٦ من الذكور و١٤ من الإناث من مواقع طبية تضمنت (المركز الوطني لنقل الدم ، ومستشفى الشهيد غازي الحريري ومستشفى بغداد التعليمي) في محافظة بغداد وقد أجريت الدراسة في المركز الوطني لنقل الدم في محافظة بغداد. تم سحب ٥ ملليلتر من الدم الوريدي من كل مريض بوساطة محاقن طبية نبيذة بعد أن تم التأكد من وجود HBs Ag وقد تم أجراء الفحص ألتوكيدي عليهم أما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد كان HBs Ag سالب لديهم. ، ثم نقل الدم المسحوب الى أنابيب بلاستيكية ، وذات غطاء محكم ، ومن ثم ترك في درجة حرارة الغرفة لمدة (١٠ -١٥) دقيقة حتى يتخثر . وضعت الأنابيب البلاستيكية في جهاز الطرد المركزي الدوار، ونقل المصل إلى أنابيب اختبار جديدة باستخدام ماصة أوتوماتيكية وحفظت بالمجمدة (20-) مْ لحين أجراء الاختبارات عليها .

الاختبارات المناعية

تضمنت الفحوصات المناعية الكشف عن الضدات النوعية للب الفيروس(Core IgM, Core IgG) باستخدام طريقة الفحص بوساطة جهاز الاليزا مبدأ الشطيرة (sandwich ELISA).

التحري عن الضدات النوعية anti-HBc IgM

أولا: مبدأ الاختبار

اعتمد مبدأ الاختبار على ارتباط الأجسام المضادةAnti-HBc IgM للمستضد اللبي في المصل المراد اختباره مع الأجسام المضادة للسطح الداخلي في الحفر لطبق الاليزا والتي ترتبط من الجهة الأخرى مع المستضدات المرتبطة بالأنزيم (Anti-HBc مع البيروكسديزHRP) لتكوين معقد مناعي وعند إضافة المادة الأساس يتكون لون ازرق داخل الحفر يتحول الى اللون الأصفر عند إضافة محلول التوقف حامض الكبريتيك (Gerlich,1993; Chapel and Haney,1993) .

ثانيا: طريقة العمل

١- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من السيطرة السالبة و١٠٠ مايكروليتر من السيطرة الموجبة الى حفرتين لكل منهما المخصصة لهما .
٢- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من المصل المخفف الى باقي الحفر.
٣- يغطى الطبق بغطاء لاصق ويحضن بدرجة ٣٧ م° ولمدة ٣٠ دقيقة .
٤- تغسل الأطباق جيدا بمحلول الغسل ٥ مرات .
٥- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من المحلول المقترن الى كل الحفر
٦- يغطى الطبق بغطاء لاصق ويحضن بدرجة ٣٧ م° ولمدة ٣٠ دقيقة كما في الفقرة رقم٣ .
٧- نزيل الغطاء ونغسل الطبق ٥ مرات بمحلول الغسل كما في الفقرة رقم٤ .
٨- نضيف ٥٠ مايكروليتر من محلول Chromogen A و50 مايكروليتر من محلول Chromogen B المجهزة مع العدة إلى كل حفرة .
٩- حضن الطبق لمدة 15دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة (25-20م°) وفي مكان مظلم .
١٠- إضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول التوقف (H_2SO_4) لإيقاف التفاعل .
١١- قراءة الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر من خلال قارئ الاليزا .

ثالثا: حساب النتائج

يتم حساب معدل السيطرة السالبة والموجبة .
Cut off value = NCX + 0.160

NCX : امتصاص السيطرة السالبة بعد امتصاص محلول blank
تعد النتيجة موجبة إذا كان معدل الامتصاص مساوي أو اكبر من قيمة القطع وتعد سالبة إذا كانت اقل .

التحري عن الضدات النوعية anti-HBc IgG

أولا : مبدأ الاختبار

يعتمد مبدأ الفحص على التنافس بين أضداد الإنسان الموجودة بالنموذجAnti-HBc IgG ومع الأجسام المضادة لسطح الداخلي في الحفر لطبق الاليزا والتي ترتبط من الجهة الأخرى مع المستضدات المرتبطة بالأنزيم المقترن (Anti-HBc مع البيروكسديز HRP) لتكوين معقد مناعي وعند إضافة المادة الأساس يتكون لون ازرق داخل الحفر يتحول الى اللون الأصفر عند إضافة محلول التوقف حامض الكبريتيك (Chapel and Haney,1993).

ثانيا: طريقة العمل

١- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من المصل المخفف والسيطرة الى الحفر.
٢- يحضن الطبق بدرجة ٣٧ م° ولمدة ٣٠ دقيقة .
٣- يغسل الطبق بمحلول الغسل ٤ مرات .
٤- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من المحلول المقترن الى كل الحفر.
٥- يحضن الطبق بدرجة ٣٧ م° ولمدة ٣٠ دقيقة و يغسل الطبق بمحلول الغسل ٤ مرات .
٦- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من المادة الأساس الى الحفر ويحضن الطبق بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة .
٧- نضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول التوقف الى الحفر لإيقاف التفاعل .
٨- قراءة الامتصاصية على طول موجي 450نانوميتر من خلال قارئ الاليزا .

ثالثا: حساب النتائج

يتم حساب معدل السيطرة السالبة والموجبة.
Cut off value = NCX + 0.5

NCX : قراءة السيطرة السالبة

النتائج والمناقشة

الدراسة المصلية serological markers

لقد أظهرت نتائج الدراسة التي أجريت على ١٠٣ مصاب بالتهاب الكبد الفيروسي HBV B للكشف عن أضداد لب الفيروس (IgG و HBV Core IgM) أن هناك٥٤ (52.4%) شخص موجبين لأضداد لب الفيروس (Core- IgG) (وجود إصابة قديمة) كما موضح في جدول (١) بينما أظهرت نتائج الكشف عن أضداد لب الفيروس (Core- IgM) وجود ٢٩ (28.2%) شخص موجبين (وجود إصابة حادة حديثة أو مستمرة) كما هو موضح في الجدول (٢) .

جدول (١) : توزيع Core-IgG بالنسبة لمجموعة المرضى

Core-IgG	Frequency	Percent
(-ve)	49	47.6
(+ve)	54	52.4
Total	103	100.0

جدول (٢) : توزيع Core-IgM بالنسبة لمجموعة المرضى

Core-IgM	Frequency	Percent
(-ve)	74	71.8
(+ve)	29	28.2
Total	103	100.0

أن Anti-HBc (Hepatitis B Core) هو أول الأجسام المضادة التي تظهر والتي تشير الى إصابة حديثة أو سابقة ، آذ يعتبر anti-HBc-IgG وسيلة مهمة في الكشف عن مرحلة الإصابة بـ HBV حيث يكون صنف IgG هو السائد في المصل والذي يشير الى إصابة قديمة أو مزمنة (Almeida,2011) . بينما يكون خلال الإصابة الحادة صنف anti-HBc-IgM هو السائد وهذا يساعد في تشخيص المرض مع وجود HBsAg positive في مصل المرضى الذي قد يتفاقم الى الحالة المزمنة (Liang ,2009) . وتبين من خلال النتائج أن وجود الصنفIgG في عينات مصل المرضى أعلى من وجود الصنف IgM في عينات مصل المرضى المصابين HBV إذ كانت النسب المئوية لكل منهما على التوالي (52.4%) (28.2%) وهذا يدل على أن نسبة الإصابة المزمنة لدى المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B أعلى من نسبة الإصابة الحادة .

علاقة لب الفيروس Core-IgG مع العمر

أوضحت نتائج الدراسة بان متوسط العمر للمرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B والموجبين لأضداد لب الفيروسCore-IgG كان أعلى (40.3889) سنة من متوسط العمر لدى المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B والسالبين لأضداد لب الفيروس Core-IgG(38.1837) سنة مع عدم وجود علاقة معنوية بين المجموعتين . لذلك فان ليس للعمر تأثير على المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي الموجبين والسالبين لأضداد لب الفيروس Core-IgG . إذ يرتبط لب الفيروسCore-IgG مع الإصابة المزمنة أو القديمة (Lin and Kirchner, 2004) كما موضح في الجدولين (٣) و(٤) .

جدول (٣) : علاقة Core-IgG مع العمر

Core-IgG\L\Patients	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error of Mean
(-ve)	49	38.1837	12.20429	1.74347
(+ve)	54	40.3889	11.39085	1.55010
Total	103	39.3398	11.77864	1.16058

جدول (٤) : العلاقة المعنوية بينCore-IgG مع العمر

	Mean Square	F	Sig.
Age\Patients * Core-IgG \Patients	124.927 138.873	0.900	0.345

علاقة لب الفيروس Core-IgM مع العمر

أوضحت النتائج الموضحة في الجدول (٥) بان متوسط العمر للمرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B والسالبين لأضداد لب الفيروس Core-IgM كان أعلى (39.432) سنة من متوسط العمر لدى المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B والموجبين لأضداد لب الفيروس Core-IgM (39.103) سنة . ولقد أوضح الجدول (٦) عدم وجود علاقة معنوية بين لأضداد لب الفيروس Core-IgM وعمر المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B حيث أن Core-IgM يرتبط فقط مع الإصابة الحادة أو الحديثة (Liang ,2009) .

جدول (٥) : علاقة Core-IgM مع العمر

Core-IgM\L\Patients	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error of Mean
(-ve)	74	39.432	12.682	1.474
(+ve)	29	39.103	9.275	1.722
Total	103	39.340	11.779	1.161

جدول (٦) : العلاقة المعنوية بينCore-IgG مع العمر

	Mean Square	F	Sig.
Age\Patients * Core-IgM\Patients	2.255	0.016	0.899
	140.088		

المصادر

Almeida ,R.A.(2011) The underlying mechanisms for the ‘‘isolated Positivity for the hepatitis B surface antigen (HBsAg)’’ serological profile. Med Microbiol Immunol 200:13–22

Chaple , H. and Haeney , M . (1993) . Basic component . In Essential of Clinical Immunology . Editors : Chapel , H. and Heaney , M . 3rdedition , Chapter I , Black well scince USA . It d , pp:8-14 .

Gerlich, W. (1993). Structure and molecular virology . In: Zuckermann A Jand Thomas H C (4th ed) .Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management. Edinburgh:Churchill Livingstone. 84-113.

Lin, K.; and Kirchner, J.T. (2004). Hepatitis B virus. J.Amer. FAm. Phus.; 69(1): 1.

Liang, T. J.(20٠٩). Hepatitis B: The Virus and Disease. Hepatology. ; 49 S13–S21. doi:10.1002/hep.22881.

CDC.(2011) .The Kirby Institute. HIV, viral hepatitis and sexually transmissible infections in Australia: annual surveillance report 2011. Sydney: The Kirby Institute, the University of New South Wales; 2011. Available from:

Guha, C.; Mohan, S.; Chowdhury, N.R. and Chuwdhury, J.R. (2004). Cell culture and animal models of viral hepatitis. Part I: Hepatitis B. J. Lab. Animal Rev. ; 33 (7).

Hou, J., Liu, Z. and Gu, F..(2005). Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. Int. J. Med. Sci. 2(1).

Raimondo ,G. ; Allain, JP. ; Brunetto , MR. ; Buendia , MA. ;Chen, DS. ; Colombo, M. ;Craxì, A.; Donato ,F.; Ferrari, C.; Gaeta, GB.; Gerlich ,WH. ; Levrero ,M. ; Locarnini ,S.; Michalak ,T. ; Mondelli,MU. ; Pawlotsky ,JM. ; Pollicino ,T.; Prati, D.; Puoti, M. ; Samuel ,D.;Shouval ,D.; Smedile ,A.; Squadrito ,G.; Trépo, C.; Villa, E.; Will, H.;Zanetti , AR. and Zoulim, F. (2008). Statements from the Taormina expertmeeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol;49: 652-657.

Aljooanin ,O. A.; Al-Hayani N. N.and Mahmood J.M . (2012). The infection with HBV and HCV and their relationship to ABO blood group among blood donors. J Fac Med Baghdad 54 (1) p:52-56.