P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2013 ,(7), (3) :55-59
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
Open Access

التحري عن فيروس Hepatitis B باستخدام تقنيات ELISA and Real Time PCR في دم ولعاب المرضى في محافظة الانبار

ثائر عبدالله حسن أمين سليمان بدوي

جامعة تكريت – كلية الزراعة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2012/09/09
تاريخ القبول: 2013/12/12
تاريخ النشر: 3/ 11 / 2014
DOI: 10.37652/juaps.2013.94738

الكلمات المفتاحية:
Hepatitis B،
ELISA،
Real Time PCR،
دم، لعاب،
الانبار.

الخلاصة:

أجريت الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية جامعة تكريت للفترة من 2011/11/1 ولغاية 2012/5/1 والتي تضمنت التحري عن فيروس التهاب الكبد نمط B في اللعاب ومقارنته بمصل الدم باستخدام تقنية الاليزا ELISA وتقنية Real Time PCR للمرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الرمادي العام ومستشفى الفلوجة العام والذين كانت لديهم اصابات مؤكدة بالتهاب الكبد الفيروسي نمط B لغرض اثبات قابلية اللعاب في نقل الاصابة، حيث كانت نتائج الدراسة كالاتي :بينت النتائج التي تم الحصول عليها ان مستضد HBsAg كان موجودا بنسبة 99.4 % وبمتوسط حسابي مقداره (1.101±0.335) في مصل الدم بالمقارنة مع 48.6 % في اللعاب وبمتوسط حسابي مقداره (0.330±0.278), والتي اعطت ارتفاعا ملحوظا عند مقارنتها بمجموعة السيطرة التي كانت بمتوسط حسابي مقداره (0.024 ± 0.039) و(0.014 ± 0.017) لمصل الدم واللعاب على التوالي, وكانت قيم T test لمجموعة مصل الدم مع مجموعة السيطرة تساوي (16.25) وللعاب مع السيطرة تساوي (4.18) وكانت ذات معنوية عالية تساوي (0 .000) بمستوى اختبار مقداره (P<0.05) كانت نسبة الارتباط Correlation بين اللعاب ومصل الدم في فحص الاليزا تساوي0.361 وذات معنوية عالية للاختبار, اما قيمة T test لها فكانت تساوي 28.902 وذات معنوية عالية جدا بمستوى اختبار مقداره (P<0.05). تم تعيين مستويات DNA HBV في عينات اللعاب ومصل الدم الموجبة لفحص الاليزا باستخدام تقنية Real Time PCR, اذ كان 95 % من عينات مصل الدم المفحوصة موجبة الحمل الفيروسي بينما في اللعاب كان 50 % من العينات موجبة HBV DNA.

المقدمة

التهاب الكبد الفيروسي نمط B هو مشكلة صحية عالمية كبرى، إذ ان ما يقارب من مليارى شخص قد تعرضوا للفيروس في جميع انحاء العالم (Lavanchy.,2004; Arora et al.,2012)، واكثر من 350 مليون شخص تتطور عندهم الاصابة مسببة الوفاة في جميع انحاء العالم (Nguyen et al., 2001).

* Corresponding author at: Tikrit University - College of Agriculture;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

يعد فيروس التهاب الكبد نمط B فيروساً صغيراً Small ومغلفاً Enveloped ذو حامض نووي منقوص الاوكسجين DNA وهو احد افراد عائلة Hepadnavirus جنس Orthohepadnavirus (Schodel et al.,1993)، كان أول وصف للمستضد السطحي لفايروس التهاب الكبد نمط B من قبل العالم Blumberg عام1965م والذي أسماه بالمستضد الاسترالي Australian Antigen (Saadoon، 1999)، إن جزيئة الفيروس الناضجة أو ما تسمى بجزيئة دان Dane Particle تكون 42 نانومتر

بالقطر, ذات غلاف مزدوج،حيث يكون الغلاف الخارجي لها مكون من الدهون ويطلق عليه بالمستضد السطحي Surface Antigen (HBsAg)، أما الغلاف الداخلي فهو اللب الاساسي Core والذي يكون مستضد اللب الاساسي (HBcAg) Antigen Core الذي يوجد في داخله المادة الوراثية بشكل DNA دائري يتمثل بـ 3200 kb (Ganem,2010)، يكون تركيب DNA محكماً ومكوناً من أربعة أطر للقراءة المفتوحة Open Reading Frame (Wen et al.,2007).

ينتشر فيروس التهاب الكبد نمط B عن طريق الدم والسوائل الجسمية الاخرى مثل اللعاب، خلال استخدام المحاقن الطبية وأدوات الجراحة وأدوات الحلاقة أو عن طريق الاتصال الجنسي أو من الأم المصابة الى وليدها عند الولادة (Kukka،2012)، حديثاً تم تطوير تقنة Real Time PCR والذي يعتمد أساس عمله على القياسات الكمية للحمض النووي DNA في الفيروسات مع زيادة في المزايا لهذه العملية من حيث الحساسية العالية, وقلة مخاطر التلوث والدقة العالية في تشخيص الـ DNA باستخدام عدد كشف خاصة معدة لهذا الغرض (Sitnik et al.,2010). إن اللعاب فيه المئات من العناصر التي قد تساعد في الكشف عن الامراض الجهازية Systemic Diseases، او كدليل على التعرض للمواد الضارة فضلا عن اعطاء المؤشرات الحيوية لحالة الصحة والمرض (Motemayel et al., 2010)، العديد من الدراسات بينت امكانية وجود HBsAg في اللعاب والعمل كناقل للعدوى بين الاشخاص (Irwin et al., 1975 ;Osterholm et al.,1979)، لذا فان من الممكن ان يكون للعاب دورا لنقل الاصابة الى الاصحاء عن طريق الاشتراك بالأدوات وخصوصا ادوات الاسنان كالفرشاة او عن طريق ادوات طبيب الاسنان الملوثة باللعاب (Goldman،2002), لذا هدفت الدراسة الى التحري عن انتقال الاصابة بفيروس HBV في دم ولعاب المرضى المصابين بالتهاب الكبد نمط B.

طرائق العمل

تضمنت الدراسة جمع 400 عينة من دم ولعاب 200 شخص منهم 175 مريضا مصابين بالتهاب الكبد الفيروسي نمط B، و25 شخصاُ أصحاء كمجموعة سيطرة Control. تم جمع عينة الدم عن طريق سحب الدم بواسطة المحقنة من الوريد مباشرة, اذ أخذ حوالي 5 مل \ مريض، اما بالنسبة لعينة اللعاب فقد تم استحصال كمية مناسبة من المرضى بواسطة أكواب خاصة معقمة ومحكمة الغلق ذات استعمال واحد Disposable و حفظت عينات الدم واللعاب في صندوق مبرد بمكعبات الثلج، وتم فصل العينات باستخدام جهاز النبذ المركزي Centrifuge ذو 4500 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقائق, ثم اخذ مصل الدم ورائق اللعاب وتم حفظه في التجميد في درجة -20 مئوي تحت الصفر لحين الفحص (Amado et al., 2006).

الكشف عن المستضد السطحي HBsAg في عينات مصل الدم واللعاب باستعمال تقنية الاليزا ELISA :

تم الكشف عن المستضد السطحي HBsAg في عينات مصل الدم واللعاب باستعمال تقنية الاليزا ELISA عن طريق استعمال عدة HBsAg ELISA Test Kit المصنوع من قبل شركة Plasmatec الامريكية و المخصص للكشف عن مستضدات HBsAg في مصل وبلازما الدم. وتم اضافة 50 مايكروليتر من عينات اللعاب بدون اي تحويرات في كمية العينة المضافة اوفي طريقة العمل الواردة من الشركة المصنعة (Noppornpanth et al., 2000).

الكشف عن الـ DNA الفيروسي في عينات الدم واللعاب باستخدام تقنية Real Time PCR:

تعد تقنية Real Time PCR من التقنيات الحديثة المستخدمة للكشف عن DNA الخلايا عن طريق مضاعفته باستخدام برايمرات متخصصة Specific Primers وأنزيمات Taq Polymerase المتخصصة في بناء سلاسل DNA، استخدمت هذه التقنية لتشخيص الحمل الفيروسي Viral Load في لعاب ودم المرضى باستخدام عدد استخلاص وتضخيم Amplification DNA الفيروسي للعينات المفحوصة.

التحليل الاحصائي Statistical Analysis :

تم التحليل الاحصائي للعينات بإيجاد قيمة T test وايجاد معامل الارتباط Correlation باستخدام نظام التحليل الاحصائي SPSS Statistics 20 : IBM, وايجاد الفروقات المعنوية لعينات مصل الدم واللعاب، وكانت الفحوصات على مستوى اختبار مقداره P (<0.05).

النتائج والمناقشة

بينت النتائج التي تم الحصول عليها ان مستضد HBsAg كان موجوداً بنسبة 99.4 % في عينات مصل الدم بمتوسط حسابي مقداره (0.335 ±1.101)، بالمقارنة مع 48.6 % في اللعاب بمتوسط حسابي له مقداره (0.330±0.278)، والتي اعطت ارتفاعا ملحوظا

عند مقارنتها بمجموعة السيطرة التي كانت بمتوسط حسابي مقداره (0.024 ± 0.039) و(0.014 ± 0.017) لمصل الدم واللعاب على التوالي, وكانت قيم T test لمجموعة مصل الدم مع مجموعة السيطرة تساوي (16.25) وللعاب مع السيطرة تساوي (4.18) وكانت ذات معنوية عالية.

جدول (1) أعداد ونسب HBsAg في مصل الدم واللعاب لمرضى التهاب الكبد الفيروسي نمط B باستخدام تقنية الاليزا ELISA

مجاميع الدراسة	العدد الكلي	HBsAg +ve					
		مصل الدم			اللعــاب		
		العدد	(%)	المتوسط	العدد	(%)	المتوسط
مرضى الدراسة	175	174	99.4	1.101± 0.335	85	48.6	0.330± 0.278
مجموعة الاصحاء	25	0	0	0.039 ± 0.024	0	0	0.017± 0.014
المجموع الكلي	200	174			85		

اوضحت نتائج التحليل الاحصائي ان نسبة الارتباط Correlation بين اللعاب Saliva ومصل الدم Serum كانت تساوي 0.361 وذات معنوية عالية جدا، هذه المعنوية العالية للارتباط بين اللعاب ومصل الدم تبين القابلية في امكانية استبدال عينة مصل الدم باللعاب في فحص الاليزا خصوصا في الدراسات الوبائية Epidemiological Studies والتي من الممكن فيها قياس قابلية اللعاب في نقل العدوى وامكانية السيطرة عليه. ان قيمة T test كانت تساوي 28.902 وذات معنوية عالية بين اللعاب ومصل الدم في فحص الاليزا وهو ما يؤكد قابلية اللعاب على نقل العدوى. كانت هذه النتائج مقاربة لما ذكره (Zhevachevesky et al.,2000) والذي بين ان HBsAg موجود في 68.9 % من مجموع عينات مزدوجة من اللعاب والمصل، اذ كان 23.8 % منها موجبة لفحص HBsAg في اللعاب في حين ان 59.5 % منها كانت في المصل، واوضح ايضا ان هذه النسبة تكون في الفترة الحادة من الاصابة وان قيمة اللعاب تنخفض لتصل الى 8.3 % في المرضى في حين ان مصل الدم سوف يبلغ 33.3 % عند التحول الى الحالة المزمنة، في حين توصل Cruz وجماعته (2011) الى أن HBsAg موجود بنسبة 93.6 % في عينات اللعاب, واوضح ايضا ان هناك توافق كبير بين نتائج اللعاب ومصل الدم بالنسبة لقيمة اختبار Kappa Value وهذه النتيجة لا تتفق مع نتائج بحثنا وذلك للقيمة العالية التي توصل اليها الباحث بالنسبة لتركيز الفيروس في اللعاب، لكن الدراسة التي اجراها (Noppornpanth et al.,2000) على عينات من اللعاب والمصل على 23 فردا مصابا بـ HBsAg حيث كان المتوسط للعينات يساوي 69.96 في المصل و 37.61 في اللعاب، اي ان 23 عينة كانت موجبة لفحص HBsAg في المصل و 22 عينة كانت موجبة في اللعاب باستخدام جهاز الاليزا وهي نتيجة مقاربة لما وجده Cruz وجماعته (2011) ولكن كلا هاتين الدراستين لم تتفق مع نتائج بحثنا, ويعود سبب الاختلاف هو قلة عدد العينات في هذين البحثين مقارنة بالعدد الكبير للعينات في بحثنا هذا، وفضلا عن اختلاف المناطق الجغرافية التي عملت بها البحوث فضلا عن نوع الاجهزة والمواد المستخدمة في هذه البحوث.

تقاربت نتائج فحص الاليزا مع ما ذكره Hutse وجماعته (2005) والذي استخدم 116 عينة للتحري عن HBsAg في اللعاب والمصل فوجد ان 39 عينة كانت موجبة للفحص في اللعاب وبنسبة تساوي 33.6% في حين ان 77 عينة كانت سالبة للفحص اي ما يساوي 66.4%، لكن مصل الدم كان موجبا في 43 عينة اي37% و 73 كانت سالبة للفحص63%.

تم تقييم مستويات DNA HBV في اللعاب ومقارنتها مع مستوياته في مصل الدم باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real Time PCR. لذا كانت نتائج الفحص هي 95 % من العينات المفحوصة موجبة للحمل الفيروسي HBV DNA، في حين ان نسبة العينات الموجبة في اللعاب كانت تساوي 50 % من مجموع العينات.

جدول(2) توزيع نتائج فحص REAL TIME PCR

نوع الفحص	الكلي	POSITIVE		NEGATIVE	
		عدد	(%)	عدد	(%)
مصل الدم SERUM	20	19	95	1	5
لعاب SALIVA	20	10	50	10	50

اتفقت النتائج مع ما ذكره Van der Eijk وجماعته (2004) الذي اعتبر ان اللعاب يعد مصدرا للحمض النووي الفيروسي HBV DNA، واقترنت النتائج مع ما وجده Jenison وجماعته (1987) الذي استطاع من تشخيص الحمل الفيروسي لـ HBV في عينات اللعاب والسائل المنوي ومصل الدم، لكن هذه النتائج لم تتفق مع ما وجده Zhang وجماعته (2008) الذي استطاع من تشخيص HBV DNA في اللعاب بنسبة تقارب 72.5 % مقارنة مع عينات مصل الدم التي كانت بنسبة 90.0 %، والسبب يرجع الى عدد العينات الكبيرة المفحوصة في هذا البحث والذي يكون اكثر قابلية في اظهار الاختلافات المعنوية عن العينات ذات العدد القليل،واكد هذا الكلام ما

وجده CAO Xian-qin (2009) والذي كانت نتائجه مطابقة للباحث (Zhang et al., 2008) وان قيمة الارتباط بين اللعاب ومصل الدم في فحص Real Time PCR كانت تساوي (0.639) وذات معنوية عالية جدا، وكذلك كانت قيمة test T للعينات المفحوصة تساوي (1.858)، ولكن كانت غير معنوية عند مستوى اختبار يساوي (P<0.05) .

الاستنتاجات:-

مما تقدم من نتائج الدراسة فانه يمكن استنتاج الحقائق العلمية التالية:-

كان تركيز المستضد السطحي HBsAg لفيروس التهاب الكبد نمط B مرتفعا جدا في اللعاب في تقنية الاليزا مما يؤكد حصول الانتقال الافقي Transmission Horizontal بين الاشخاص المصابين والملامسين لهم ولسوائل اجسامهم، وأكدت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real Time PCR وجود الحمض النووي الفيروسي في عينات اللعاب وبكميات تكفي لان تكون معدية والتي تؤكد قدرة اللعاب كوسيلة لنقل الفيروس ونشر العدوى.

كانت نسبة الارتباط بين اللعاب ومصل الدم في الاصابة بفيروس التهاب الكبد نمط B وثيقة وعالية المعنوية في كلا تقنيتي الاليزا و Real Time PCR.كانت تقنية Real Time PCR من التقنيات الجيدة التي يمكن بها تشخيص الامراض عن طريق تحديد الحمض النووي للممرض

المصادر

1- Motamayel، A. ; Davoodi P. ; Dalband M. and Hendi S.S. (2010). Saliva as a Mirror of the Body Health, DJH 2010، Iran، Vol.1، No.2.

2- Jenison, S.A. ; Lemon S.M.; Baker L.N. and Newbold J.E. (1987). Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men, The Journal of Infectious Diseases، Vol 156, No. 2، p-p:299-307

3- CAO X.، GAO T. (2009). Detection of HBV-DNA in Hepatitis B Patients' Saliva by Fluorescence Quantitative PCR, Chinese Journal of Laboratory Medicine، Vol. 03,.

4- Cruz H. and Ferreira E. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen، Journal of Clinical Laboratory Analysis، Vol. 25، Issue 2،p-p :134-141.

5- Ganem D. (2010). Hepadnaviruses - Hepatitis B "Hepatitis B is a retrovirus with a bad sense of timing, Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease, 4th ed.,Ch. 43, p-p : 426-432.

6- Goldmann D. (2002). Blood-borne pathogens and nosocomial infections، Journal of Allergy Clinnic Immunology, Vol. 110, No 2،p-p: 21-26.

7- - Hutse V. ; Verhaegen E. ; Cock L. (2005). Oral Fluid as a medium for the detection of the Hepatitis B surface antigen،Journal of medical virology،Vol 77,issue 1, p-p 53-56

8- Irwin G. ; Allen A. ; Bancroft W. (1975). Hepatitis B Antigen in Saliva, Urine, and Stool, Infection and Immunity J.، Vol. 11. No. 1, p-p : 142-145.

9- Kukka C. (2012). Preventing Hepatitis B at Home and in Personal Care Settings, Hepatitis B Fact Sheet, HCSP. Version 2.5. February 2012.

10- Lavanchy D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures, World Health Organization, Communicable Disease Surveillance and Response، Blackwell Publishing Ltd, Journal of Viral Hepatitis, Vol. 11, Geneva, Switzerland، p-p: 97–107.

11- Nguyen V. and Dore G. (2001). Prevalence and Epidemiology Of HepatitIis B، a guide for primary care providers.

12- Noppornpanth S.; Sathirapongsasuti N.; Chongsrisawat V. and Poovorawan Y. (2000). Detection Of HbsAg and HBV DNA In Serum and Saliva Of HBV Carriers, Southeast Asian J Trop Med PubIic Health, Vol. 31, No. 2, Thailand.

13- Osterholm M. ; Max B. ; Hanson M. and Polesky H. (1979). Potential risk of salivary-mediated viral hepatitis type B transmission from oral exposure to fomites, J. Hyg., Camb.,Vol 83, No 487,p-p:487-490.

14- Saadoon، I. H. (1999). Serlogical Response to Hepatitis Virus Type B,Type D,and Type C Among High Risk Group in Tikrit City، MSc Thesis, College of Medicine، University of Tikrit.

15- Schodel F.; Peterson D.; Zheng J.; Jones J.; Hughes J. and Milich D. (1993). Structure of Hepatitis B Virus Core and e-Antigen، The Journal

19- Zhang YL. ; Pan HY. ; Chen CR. ; Lou GQ. ; Ye RX. and Lu DR. (2008). The roles of saliva testing for preventing hepatitis B virus spreading, Chinese Journal of Preventive Medicine،Vol 42, No.8،p-p: 596-598.
20- Zhevachevsky N.; Nomokonova N.; Beklemishev A. and Belov G. (2000). Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: Diagnostic and epidemiological significance, Journal of Medical Virology, Volume 61, Issue 4, p-p: 433–438.
21- Amado, L. A. ; Villar، L. M. ; de Paula, V. S. ; de Almeida، A. J. and Gaspar, A. C. (2006). Detection of hepatitis A,B and C virus –specific antibody using oral fluid for epidemiological studies،Mem instu Oswaldo Cruz, Rio de Janereio,Vol.101(2) Brasil :149-155.
of Biological chemistry, Vol. 268, No. 2, Issue of January 15, p-p. 1332-1337.
16- Sitnik R.، Paes Â. ; Mangueira C. and Pinho João R. (2010), A Real-Time Quantitative Assay for Hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV Genotypes, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, Vol.52, No.3, p-p : 119-124.
17- Van der Eijk A. ; Niesters H. and Hansen B. (2004). Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent، Journal of Clinical Virology ،Vol 29, Issue 2، P 92-94
18- Wen Y. ; Golubkov V. ; Strongin A. ; Jiang W. and Reed J. (2007). Interaction of Hepatitis B Viral Oncoprotein with Cellular Target HBXIP Dysregulates Centrosome Dynamics and Mitotic Spindle Formation, The Journal of Biological Chemistry, VOL. 283, NO. 5,، USA، pp: 2793–2803.

DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS USING ELISA AND REAL TIME PCR TECHNIQUES IN PATIENTS' BLOOD AND SALIVA IN AL- ANBAR PROVINCE

THAER A. HASAN **AMIN S. BADAWY**

ABSTRACT:

The present study has been carried out at the laboratories of the department of biology at the college of Education-University of Tikrit for the period from 1st Oct to 1st May 2012. The study consisted of the investigation about Hepatitis B in the saliva as compared with serum by using the ELISA and Real Time PCR techniques. Patients fallen asleep and revisers of the Ramadi General Hospital and the Fallujah General Hospital and who had confirmed cases hepatitis B for the purpose of pattern prove of saliva in the portability infection, where the results of the study were as follows: The results obtained showed that HBsAg antigen was found with 99.4% and (1.101± 0.335) mean ±SD in serum as compared with 48.6% in saliva with a (0.330±0.278) mean ±SD, that gave a noticeable increase when comparing with the control group (0.039 ± 0.024) and (0.017±0.014) for serum and saliva respectively. The value of T test for serum and control group equals (16.25), while the value of T test for saliva and control group equals (4.18) which has high significance equals (0.000) with a test value equals ($P<0.05$). The proportion of correlation between saliva and serum in ELISA test equals (0.361) with high significance of test while the value of T test for them equals (28.902) with high significance of test with a test value equals ($P <0.05$). The genetic factor has been used in order to determine the levels of HBV DNA in the samples of positive saliva to test ELISA by using Real Time PCR. 95% from tested serum samples were positive to the viral load. While in saliva 50% from the samples HBV DNA was positive .