

**دراسة في مستوى الاستجابة المناعية
الخلطية المتخصصة والخلوية غير المتخصصة
في مصول مرضى التهاب الكبد الفيروسي**

المدرس المساعد
عماد هادي حميد
جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

دراسة في مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة

والخلوية غير المتخصصة في مصول مرضى

التهاب الكبد الفيروسي

المدرس المساعد

عماد هادي حميد

جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

الخلاصة:

- اشتملت هذه الدراسة على عينات دم اصحاء ومرضى التهاب الكبد الفيروسي.
- حيث سجلت مستويات الكلوبولينات المناعية IgA , IgM , IgG لارتفاعا معنويا لمرضى HBV الحاد والمرزم ومرضى HCV لدى مقارنة مع مجموعة السيطرة .
- حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة لمستوى الكلوبولين المناعي صنف IgG لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن مرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة وجود ارتفاع معنوي ملحوظ مقارنة بمجموعة السيطرة وبمعدل $t=67.3, p<0.05, t=15.7, p<0.05, t=72.5, p<0.05$ على التوالي. كما أظهرت نتائج هذه الدراسة لمستوى الكلوبولين المناعي IgM لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة فقط لوحظ ارتفاع معنوي مقارنة مع مجموعة السيطرة، وبمعدل $t=29.5, p<0.05, t=9.20, p<0.05, t=28.3, p<0.05$ على التوالي، $13.1\pm 20.33, 225.8\pm 30.60, 131.8\pm 23.52, 240.2\pm 46.39$ على التوالي. أما مستوى الكلوبولين المناعي IgA لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة فقد كان هنالك ارتفاع معنوي ملحوظ بين الإصابة ومجموعة السيطرة $t=35.4, p<0.05, t=5.6, p<0.05, t=38.6, p<0.05$ ، وبمعدل $218.9\pm 31.45, 449.2\pm 72.58, 249.4\pm 44, 461.1\pm 67.8$ على التوالي.
- أكدت فحوص الدم وجود انخفاض معنوي في التعداد الكلي لخلايا الدم البيض في جميع المرضى لدى مقارنة مع مجموعة السيطرة . كما أظهرت أعداد الخلايا Basophils, Neutrophil, Monocytes, Lymphocyte فروقات معنوية بين المرضى ومجموعة السيطرة.

المقدمة واستعراض المراجع

يعد فيروس التهاب الكبد نمطي B و C من الفيروسات الخطرة التي تهدد العالم لما يسببه من مشاكل صحية واجتماعية وسرعة في الانتشار (Rafael R., 1996; Shapero et.al., 1995). تمكن خطورة الإصابة بالفيروس نمط B والفيروس نمط C في عدم ظهور اعراضهما إلا بعد فترة حضانة طويلة يبدو خلالها المريض سليماً معافى. فضلاً عن ذلك فإن الإصابة بهما يمكن أن تحدث في عمليات نقل الدم وعن طريق الاتصال الجنسي ومن الأم إلى الجنين حيث ان كليهما يسبب الإصابة عند دخولهما مجرى الدم (Shafritz D et.al., 1992).

يعد فيروس التهاب الكبد باكثر عدوى من فيروس نقص المناعة المكتسبة الذي يسبب مرض الإيدز (Williams M., 1999). وانه ٩٥% من المرضى يشفون شفاء تاماً وبدون مضاعفات جانبية اما البقية يستمر الالتهاب لديهم لفترة أطول من ستة أشهر ويصبح مزمناً وقد يتطور المرض إلى تليف الكبد (Cirrhosis) وسرطان الكبد، والموت (Satish,M. et.al 1986;). في الأطفال فان ٩٥% منهم يصبحون حاملين للمرض بصورة مزمنة وعلى المستوى العالمي يكون الأطفال هم أكثر عرضة للإصابة بهذا النوع من الالتهابات. ومن الممكن منع الإصابة بهذا الفيروس اللقاح الممضاد له (Scott et.al 1989;).

يصيب فيروس التهاب الكبد نمط C: ١٧٠ مليون إنسان على مستوى العالم تقريباً ويقدر عدد الذين يموتون سنوياً بهذا الوباء ١٠.٠٠٠ إنسان كما أن ٨٥% من المرضى الذين تعرضوا لفيروس التهاب الكبد C حاملون للمرض بصورة مزمنة (Pawlotsky J.M., 1995).

يؤثر فيروس التهاب الكبد B و C في خلايا الكبد المصاب ويؤدي ذلك إلى خلل في وظائف الكبد منها نقص في تكوين عناصر تخثر الدم وهذا بدوره يسبب فقر الدم وهبوط ضغط الدم وقلة إيصال الاوكسجين والمواد الغذائية إلى خلايا الجسم. أن اكثر المجاميع تعرضاً للإصابة هم مرضى التلاسيميا وهو مرض وراثي شائع في منطقة شرق البحر المتوسط الشرق. وهو معروف بعمليات متكررة في نقل الدم وقد تجرى له عمليات استئصال الطحال (Lamballeris X et.al., 1996; Dienstag E, et.al 1980).

كما أن مرضى الكلية الصناعية من مجاميع الاخطار هم اكثر عرضة للإصابة بفيروسين (Karhol,H. et.al 1995). وكذلك يصيب الفيروس مرضى السكري حيث أن الإصابة الفيروسية قد تحطم جزراً لانكر هانز بصورة غير مباشرة عن طريق تكويين أضداد ذاتية (Mazaoleini et.al, 1994) Autoantibodies. أما مرضى السرطان المعالجون

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد
بالمواد الكيميائية فتكبح فيهم الاستجابة المناعية مما يؤهلهم للإصابة بكل من
الفيروس سي HCV و HBV .

فيروس التهاب الكبد نمط ب HBV :
شكل الفيروس وتركيبه:

بينت دراسات المجهر الالكتروني Electron Microscope والتألق
المناعي Immune Fluorescence ان فيروس HBV عبارة عن جسيم معقد
حجمه 42 نانوميتر محاط بغلاف مزدوج وبداخله محفظه اللب Nucleocapsid
والتي تحيط بالحامض النووي DNA المزدوج السلسلة (Ockenga J et al.,
1997). المستضد الموجود في لب الفيروس يشار اليه بالمستضد اللبي للفيروس
HBcAg وهذا المستضد يظهر فقط في نواة خلايا الكبد Hepatocytes خلال
الاصابة الحادة من HBV وازداد المستضد اللبي تتولد مبكراً في المرحلة الحادة
وبعد فترة قصيرة من ظهور الاعراض (Rogers A. et al., 2003). أما المستضد
الموجود على سطح الفيروس فيسمى بالمستضد السطحي للفيروس HBsAg . وهذا
المستضد ذو ثلاثة اشكال مظهرية هي:

- جسيم كروي كبير قطره 42 نانوميتر ويعرف بجسيم دان وهو يمثل
الفيروس نفسه وتواجهه يعكس الإصابة بالفيروس .
- جسيم مستدير قطره 22 نانوميتر.
- جسيم أنبوبي Tubular قطره 22 نانوميتر وطوله يتراوح بين 50-200
نانوميتر .

(Herk, et al 2000; kibbyT et al., 1999; woodruff B. et al, 2001
وقد تم تشخيص مستضد آخر يرتبط بالمكونات اللبية لفيروس HBV يشار له بـ
HBeAg وان وجود هذا المستضد في المرضى الحاملين للمستضد السطحي
HBsAg يدل على ان الإصابة فعالة وحادة وبقاءه له علاقة وثيقة بالقدرة الامراضية
للفيروس أما وجود اعداد هذا المستضد (Anti-HBe Ag) فهذا يدل على ان
الإصابة اصبحت بسيطة ومرحلة التضاعف للفيروس بدأت بالانحدار (Bradley
D. et al, 1988) .

طور التضاعف والطور التكميلي لفيروس التهاب الكبد نمط ب HBV :
يمر فيروس التهاب الكبد HBV بطورين : الطور الاول طور التضاعف
اماالطور الثاني فيسمى بالطور التكميلي وكل طور يتضمن مرحلتين . (William
M., 1999; Gonsalves, 1993)

الطور الأول : طور التضاعف Replication Phase :
المرحلة الأولى First Stage : تتميز هذه المرحلة بالتحمل المناعي Immune
tolerance عند البالغين ، و فترة الحضانة تستغرق حوالي (2-4) أسابيع مقارنة
بإصابة حديثي الولادة . وفي هذه المرحلة يستمر تضاعف الفيروس بشكل فعال .

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

المرحلة الثانية Second Stage :

تتميز هذه المرحلة بتطور وتحسن الاستجابة المناعية وهذا يؤدي إلى حث الخلايا لانتاج السايٲوكينات Cytokins والتحلل المباشر للخلية وفي هذه المرحلة مستوى الدنا DNA لفيروس التهاب الكبد B يهبط في المصل كما أن عدد الخلايا المصابة ينخفض .

و في المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي الحاد Acute HBV هذه المرحلة تستغرق حوالي (٣-٤) اسابيع . أما المصابون بالتهاب الكبد الفيروسي المزمن Chronic HBV فانها تستغرق أكثر من ١٠ سنوات مؤديا بذلك إلى حالة تشمع الكبد cirrhosis .

الطور الثاني : الطور التكميلي Integrative phase :

ويتمثل بالمرحلتين الثالثة والرابعة :

المرحلة الثالثة third stage :

تبدأ هذه المرحلة بنهاية تضاعف الفيروس (Viral Replication) مع اختفاء المستضد HBeAg وظهور أضدادها Anti-HBeAg . وفي هذه المرحلة يبقى المصابون حاملي المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد HBsAg ، والسبب في ذلك يعود إلى تداخل S gene في المادة الوراثية للخلية الكبدية.

المرحلة الرابعة fourth stage :

تختفي عندهم المستضدات السطحية لفيروس التهاب الكبد B (HBsAg) وفي هذه المرحلة تبدأ ظهور الاجسام المضادة للمستضد السطحي Anti-HBsAg وكذلك نلاحظ ظهور Anti-HBe واختفاء المادة الوراثية للفيروس . (Shishido, W et al., 1999).

الامراض المناعية لفيروس التهاب الكبد الفيروسي نمط HBV :

تؤكد الدراسات ان تلف خلايا الكبد خلال الحالات الحادة والمزمنة في التهاب الكبد الفيروسي HBV يحدث بسبب المناعة ونتيجة التغير في الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية عند الاصابة بالفيروس.

الاستجابة المناعية الخلوية دورا كبيرا في الامراضية ، حيث ترتبط الخلايا اللمفية التائية السامة Cytotoxic T cells بمعقد التوافق النسيجي MHC I الحاوية على المستضد اللبي لفيروس التهاب الكبد HBcAg والموجود على سطح الخلية الكبدية hepatocytes والتي تكون هدفا مباشرا لتلك الخلايا عندها يبدأ موت الخلية المبرمج (apoptosis (programmed cell death) بواسطة السايٲوكينات cytokines والبرفورين perforin (William M., 1999; Chisar Fand). أما مستضدات فيروس التهاب الكبد في البلازما فتؤخذ من قبل البلاعم الكبيرة Macrophage عندها ترتبط بببتيدات فيروس HBV بالمعقد التوافق النسيجي MHC II وتقدم للخلايا التائية المساعدة Helper T cells CD4 ونتيجة لذلك يزداد انتاج السايٲوكينات وبالتالي يزداد عدد جزيئات المعقد التوافق

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

النسجي MHCI على سطوح الخلايا الكبدية ويقل تضاعف الفيروس. (Chisari (F.V., 1997). أما دور الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response فانها تسبب جزء من التلف بسبب تفاعل اضرار المستضد اللبي مع المستضدات الموجودة على سطوح اغشية خلايا الكبد مما يؤدي إلى حدوث مناعة ذاتية (Autoimmunization) (Sallberg M.and Maruyama, 2000) .

المظاهر السريرية للإصابة : Clinical Manifestations of HBV

أ. فيروس التهاب الكبد B الحاد Acute HBV :

التهاب الكبد الفيروسي الحاد عادة يكون مرضا سليم العاقبة ويتم الشفاء والتخلص منه في اكثر من 90% من الحالات ويتطور في (0.1-1%) من الاصابات إلى الحالة المزمنة (Stroffolini T. et al, 1989; Bonanni P et al, 1990). في مرحلة الالتهاب الحاد من الإصابة يكون المصل موجبا للمستضد السطحي HBsAg والمستضد "e" HBeAg للفيروس ومستوى عاليا من الأجسام المضادة IgM للمستضد اللبي (Stroffolini T et al, 1993) ومن الأعراض المتقدمة للإصابة بالتهاب الكبد الحاد هي : حمى ، غثيان ، تقيؤ ، فقدان الشهية واليرقان حيث ظهرت في 75% من المرضى المصابين . ومعظم المصابين البالغين يشفون تماما من الفيروس نتيجة لفعالية خلايا الجهاز المناعي (Dardanoni L. et al, 1988).

ب. فيروس التهاب الكبد B المزمن Chronic HBV :

يتميز التهاب الكبد الفيروسي المزمن بوجود المستضد السطحي لفيروس التهاب HBsAg في المصل لاكثر من ستة اشهر حيث يحدث بنسبة (5-10%) في البالغين ، 30% في الاطفال ، 90% في المولودين حديثا (Brook M. et al., 1989) .

فيروس التهاب الكبد C (HCV):

يعد من الفيروسات المغلفة بالشحوم Lipid envelope ويمتلك شريط RNA مفرد يحوي تقريبا 10,000 نيوكليوسايد بقطر 50-60 نانومتر (Sakugawa et al., 2001).

وبائية فيروس التهاب الكبد HCV Epidemiology of HCV

يعد فيروس التهاب الكبد C من أهم المشاكل الصحية في العالم، حيث تم تشخيصه عام 1988 (Smith D. et al., 1997). وبيّنت الإحصائيات أن نسبة انتشار الـ HCV في الولايات المتحدة الأمريكية كانت 18% أي ان هنالك 3.9 مليون من السكان مصابون بالـ HCV و 2.7 مليون إصابة مزمنة (Goldstein and Willam, 2002).

أعلى نسبة انتشار للـ HCV كانت بين الأشخاص الذين يتعرضون لعمليات نقل الدم المستمرة و (10%) بين مرضى الكلى الصناعية، وأقل نسبة انتشار كانت بين

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

العاملين بالصحة، ومن الأم المصابة إلى الجنين خلال فترة الحمل حيث بلغت 1% (Franguel L et al., 1992). (50-80)% من مستخدمي الأدوية بالحقن يكونوا معرضون للإصابة بالـ HCV (Ruiz J et al., 1992). خطورة الإصابة تزداد إذا تزامنت مع الإصابة بفيروس العوز المناعي (HIV) (Choo Q. et al, 1989).

المظاهر السريرية للإصابة HCV: Clinical Manifestation of HCV

أ. فيروس التهاب الكبد نمط C الحاد Acute hepatitis:

التهاب الكبد الفيروسي الحاد نادراً ما يُمَيِّز كظاهرة سريرية. ومن أهم الأعراض والعلامات السريرية لالتهاب الكبد الفيروسي نمط C الحاد تتضمن مستوى عالياً من انزيمات الاميفوترانسفيريز aminotransferase، ويرقاناً وتعب وفتور وألم في الجهة اليمنى العليا من البطن (Brettler D.B., 1990).

يقدر مجال حدوث التهاب الكبد الفيروسي C الحاد في فرنسا بـ 5000-6000 حالة سنوياً وان 16.6% منها فقط ترافقها أعراض مرضية (Kasper CK, 1993). حالياً معظم حالات التهاب الكبد C الحاد تعود إلى الأدوية المستخدمة عن طريق الوريد أو التعرض للإصابة من المستشفى (Nosocomial exposure) (Liang T. et al., 1991)

فقد وجد أن معدل انتقال الإصابة بين مستخدمي الأدوية عبر الوريد intravenous Drug uses عالية جداً تصل 10% سنوياً (Nagamin T et al., 1996). وان (50-90)% من المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي C الحاد تتطور إلى الحالة المزمنة عند غياب المعالجة (Abuaf N. et al, 1993).

ب. فيروس التهاب الكبد نمط C المزمن Chronic Hepatitis:

يعد التهاب الكبد الفيروسي نمط C المزمن أكثر أسباب حدوث التهابات الكبد المزمنة، تشمع الكبد (Cirrhosis)، سرطان الكبد في البلدان الصناعية (McHutchison J.G., 1998). وقد وجد أن (30-70)% من المصابين بسرطان الكبد والوفيات المرتبطة بمضاعفات التهاب الكبد هم مصابون بفيروس التهاب الكبد HCV. (Lashner B. et al., 1988; Hayllar K. et al., 1991).

استخدام الأدوية المأخوذة عن طريق الوريد هي الأكثر في نقل الإصابة وعلى الأكثر بين الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن 40 سنة (Chretein, 1992). وقد أشار (Alberti, 1982) إلى أن معدل الإصابة المزمنة بالفيروس HCV حسب العمر كانت 75% بين البالغين، 55% في الأطفال.

وبشكل عام كانت مضاعفات الإصابة المزمنة بالتهاب الكبد الفيروسي C تحدث بعد السن (10-20) سنة من بدء نشوء الإصابة (Martini E et al., 1988) وأن (15-40)% من المصابين بالتهاب الكبد C المزمن يتقدم بهم المرض إلى حالة تشمع الكبد Cirrhosis وقد يؤدي تقدم المرض إلى حدوث سرطان الكبد.

وعند تفاقم هذه الحالة فإنها تؤدي إلى التشمع (Cirrhosis) إذا تركت بدون علاج ولو أن بعض الحالات تتراجع هذه تلقائياً ومن المعروف أن التهاب الكبد

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

المزمن هو أكثر شيوعا عند الذكور والحالة تحدث بصورة رئيسة بين العشرين والخمسين عاما .

ومن أهم اعراض هذا الالتهاب: اوجاع المفاصل وطفح جلدي وقلّة الصفائح الدموية وكريات الدم البيض وبيلة بروتينية تعزى إلى آفات كبيبية وقد يعاني بعض المرضى من اعراض التهابية مزمنة والتهاب درقي مزمن وأمراض أخرى يحتمل ان تكون أسبابها امراض المناعة الذاتية

(Auto immune disease) (Edward L.and Kramitt , 1998) .

المواد وطرق العمل:

تحديد نماذج الدراسة:

تم جمع نماذج دم من المتبرعين ومرضى فقر دم البحر الابيض المتوسط وعلى

الشكل التالي:

المجموعة الاولى : شملت (٦) اشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة .

المجموعة الثانية : شملت (٦) اشخاص مصابين بالتهاب الكبد الفايروسي B

الحاد.

المجموعة الثالثة : شملت (٦) اشخاص مصابين بالتهاب الكبد الفايروسي B

المزمن .

المجموعة الرابعة : شملت (٦) اشخاص مصابين بالتهاب الكبد الفايروسي

حاملين Anti HCV

جمع العينات:

تم تقويم نماذج الدراسة حسب الجنس والفئة العمرية فقد نظمت استمارات خاصة

للمرضى تحتوي على الاسم والعنوان والجنس والمعلومات السريرية والمختبرية.

استمارة لمرضى فقر دم البحر الابيض المتوسط، استمارة لمرضى الكلية

الصناعية واستمارة لمرضى الأورام واستمارة لمرضى السكري. تم سحب (5مل دم)

من المرضى بواسطة محقنة طبية معقمة ويوضع في أنبوبة اختبار معقمة ومحكمة

الغلق وفصل المصل بنبذه بسرعة 500 دورة /دقيقة ونقل إلى أنبوبة اختبار معقمة

وحفظ بدرجة 20-م بعد تثبيت المعلومات حول كل عينة لحين تهيئة الفحص

المختبري.تم اخضاع كل نموذج في الفحوص المستخدمة في الدراسة مرة واحدة

واعيد اختبار العينات الموجبة .

المواد:

1. العدد التشخيصية:

Hepanostika HBsAg Microelisa System:

مزود من شركة Technika Organon يحتوي على:

Coated strips	8-well strips
Enzyme Tracer	1 viaL, 0.7ml
Negative control	1 viaL, 1.3ml
Positive control	1 viaL, 1.2ml
Tracer diluent	1 viaL, 30ml
Washer buffer	1 viaL, 40ml
Chromogen	1 viaL, 9ml
Substrate	1 viaL, 9ml

2. العدد التشخيصية Anti-HCV Enzyme Immuno Assay Kit
مزود من شركة Teknika Organon يحتوي على:

Coated strips	24 8-well strips
Enzyme Tracer	1 viaL, 0.7ml
Negative control	1 viaL, 1.3ml
Positive control	1 viaL, 1.2ml
Tracer diluent	1 viaLs, 14ml
Washer buffer	2 viaLs, 30ml
Chromogen	2 viaLs, 40ml
Substrate	2 viaLs, 9ml
Blocking reagent	1 viaL, 30ml

طرائق العمل :

تشخيص المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد (ب) HBsAg باستعمال طريقة المقايسة المناعية الانزيمية ELISA:
1. تم اضافة 100 مايكرومل من كل نموذج إلى جميع حفر الأشرطة Microelisa strips عدا السيطرة.

يضاف (100) مايكرومل من Positive control في حفرة.

يضاف (100) مايكرومل من negative control في حفرة

2. تم تغطية الأشرطة بغطاء لاصق.

3. ثم تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

٤. يزال الغطاء وتغسل أربع مرات بجهاز الغسل الأوتوماتيكي وباستعمال داري
الغسل ويجفف جيداً.

٥. يضاف (100) مايكرومل من الـ Conjugate [أضداد نوعية معلمة بالإنزيم
anti-HBS-HRP] في كل حفرة من النماذج والسيطرة.

تحضير الـ conjugate:

No.of strips عدد الأشرطة	1	2	4	6	8	10	12
Conjugate diluent (ML)	1	2	4	6	8	10	12
Conjugate concentration (ML)	20	40	80	120	160	200	240

٦. تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.

٧. يغسل أربع مرات بوساطة جهاز الغسل الأوتوماتيكي وتجفف جيداً.

٨. يضاف (100) مايكرومل من المادة الركيزة substrate في كل من السيطرة
والنماذج.

تحضير المادة الركيزة substrate:

No.of strips عدد الأشرطة	1	2	4	6	8	10	12
Substrate solution (ML)	1	2	4	6	8	10	12
Chromogen concentration	20	40	80	120	160	200	240

٩. تحضن بدرجة 37م ولمدة نصف ساعة.

١٠. يضاف (100) مايكرومل من حامض الكبريتيك (1M H₂SO₄) لكل
حفرة.

تشخيص الأجسام المضادة لفيروس التهاب الكبد C (Anti-HCV) باستخدام
طريقة المقايسة المناعية الإنزيمية ELISA:

١. تم اضافة 200 مايكرومل من Diluent de Muesters في كل حفرة + 10
مايكرومل من المصل.

٢. ثم أضفنا (200 مايكرومل) من Positive contrl ، أضف (200 مايكرومل)
من Negative control كل منها في حفرة.

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

٣. تغطي الأشرطة بالغطاء اللاصق.
 ٤. تحضن لمدة ساعة كاملة وبدرجة 37م.
 ٥. يزال الغطاء اللاصق وتغسل أربع مرات بجهاز الغسل الأوتوماتيكي وباستعمال دارئ الغسل ويجفف جيداً يضاف (100) مايكرومل من الـ Conjugate في كل حفرة من النماذج والسيطرة .
 ٦. تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.
 ٧. يغسل أربع مرات بوساطة جهاز الغسل الأوتوماتيكي وتجفف جيداً.
 ٨. يضاف (100) مايكرومل من المادة الركيزة substrate في كل من النماذج والسيطرة.
 ٩. تحضن في الحاضنة 37م ولمدة نصف ساعة.
 ١٠. يضاف (100) مايكرومل من حامض الكبريتيك (1M H2SO4) لكل حفرة.
- فحص الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد Single Radioactive

Immunodiffusion assay

١١. استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد لتقدير مستوى الكلوبولينات المناعية IgG, IgM, IgA, والمتتم C3, C4 وصفت باختبار منسيني Mancini test.
١٢. سحبت عينات الدم الوريدي بحقنة معقمة ثم وضع الدم في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع تخثر.
١٣. سحب المصل بوساطة ماصة باستور معقمة وحفظ في الثلاجة بعبوات معقمة بدرجة حرارة -20م.
١٤. وضع 5مايكروليتر من عينات المصل في حفر الأطباق المرقمة من 1-12 والحاوية على الـ Agaros، 0.15% من Sodium Azide والمصل المضاد أحاديالتخصص Monospecific Anti-serum.
١٥. أغلقت الأطباق جيبداً ووضعت في الثلاجة بدرجة 4م لمدة 72 ساعة في حالة IgG, IgA و 48 ساعة في حالة IgG.
١٦. تم إخراج الأطباق من الثلاجة وبعدها تم قياس قطر حلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة بوساطة المسطرة الخاصة للقياس.
١٧. وقد تم استعمال الجدول المرفق مع عدة الفحص المجهزة من الشركة لإيجاد قيمة التركيز المقابلة لقطر حلقة الترسيب مباشرة وقد تم تسجيل النتائج بوحدة mg/dL.

طريقة احتساب النسبة المئوية لكل خلية من خلايا كريات الدم البيضاء :-

Differential Lenkocytes count (DLC)

١. توضع قطرة من الدم المراد فحصه مسحوبة بواسطة انبوبة زجاجية شعرية (capillary glass) في منتصف شريحة زجاجية وعلى بعد اسم من حافة الشريحة.

دراسة في مستوى الاستجابة المناعيةم.م عماد هادي حميد

٢. باستعمال شريحة زجاجية اخرى يتم نشر قطرة الدم بتحريكها للخلف وبزاوية 30° درجة.
٣. اترك الشريحة الزجاجية الحاوية على مسحة الدم لتجف بالهواء.
٤. اغمر الشريحة بصبغة لشمّن لمدة دقيقتين.
٥. اغسل الشريحة بالماء المقطر D.W و اتركها خمس دقائق لتجف.
٦. افحص بالعدسة الزيتية (Oil immersion) واحسب ١٠٠ خلية بيضاء وسجل النسبة المئوية لكل نوع من الخلايا لبيضاء.

النتائج:

Group s N O.	Acute HBV	Chronic HBV	Antic HCV	Control
1	1082.0	٥٧٠.٤	١٠٨٢.٠	٢٢٨.٥
2	1785.0	١٠٣١.٢	١٨١٩.٩	٩٨١.٣
3	3079.6	٢١٤٢.١	٣٠٠٢.٤	٢٢٨.٥
4	2276.2	١٠٣١.٢	٢٤١٥.٢	١٤٠.٤.٦
5	1946.2	٩٨١.٣	١٨١٩.٩	١٠٣١.٢
6	3079.6	١٠٨٢.٠	٢٨٥٠.٥	١٥٧٧.٥
me an	± ٤٤٦.٩ ٢٢٠٣.٦	± ٢١٨.٩ ١١٣٩.٦	± ٣٠٣.٣ ٢١٦٤.٩	± ٢٣٨.٥ ٩٢٧.٥
X ²	X ² = ٢٠.٤	X ² = ٢١.٣	X ² = ١٨.٩	

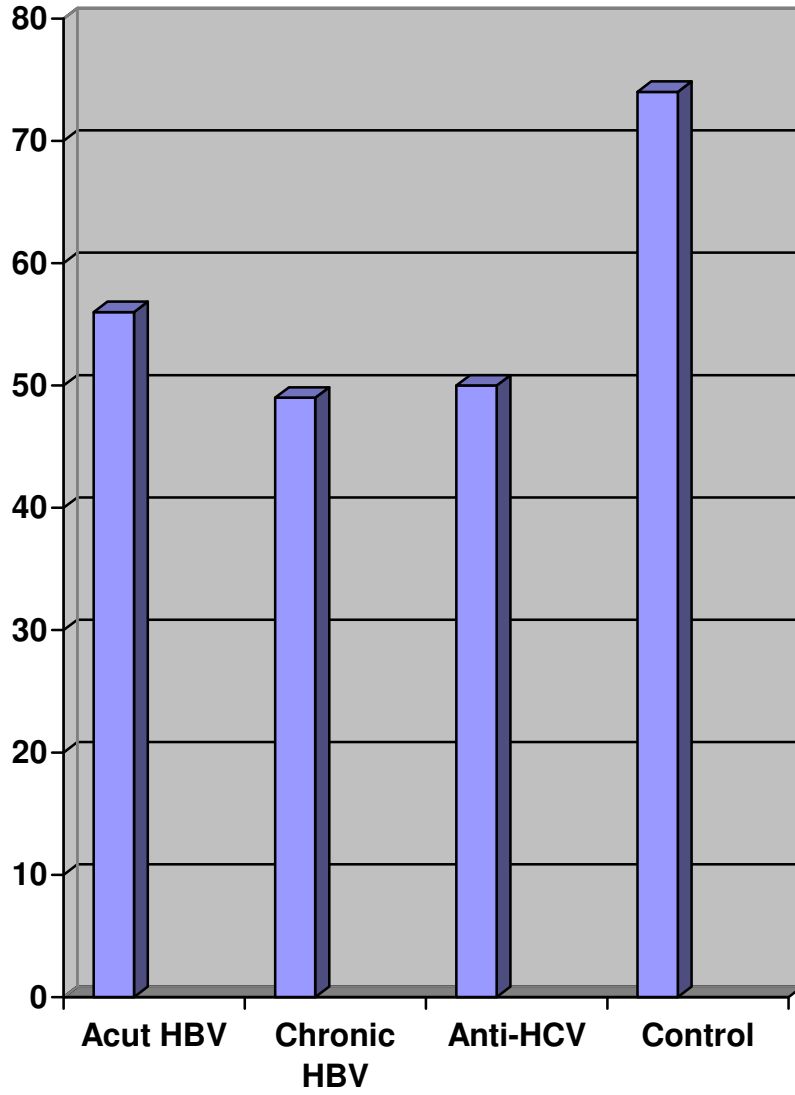
جدول (1) : مستوى الكلوبولين المناعي IgG mg/dl بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة.

Group s NO	Acute HBV	Chronic HBV	Antic HCV	Control
1	114.4	٦٨.٦	١٢٥.٦	١٧٤.١
2	200.7	١١٩.٩	١٩٣.٩	٨٣.٠
3	338.5	٢٣٥.٩	٣٣٨.٥	١١٤.٤
4	221.6	١١٤.٤	٢٥٠.٧	٦٣.٩
5	٢٣٥.٩	١٠٨.٩	١٨٧.٦	٩٣.١
6	٣٣٠.١	١٤٣.١	٢٥٨.٢	٣٠.٣
me an	±٤٦.٣٩ ٢٤٠.٢	±٢٣.٥٢ ١٣١.٨	±٣٠.٦٠ ٢٢٥.٨	±٢٠.٣٣ ٩٣.١
X ²	X ² = ٢٣.٨	X ² = ١٥.٥	X ² = ٢٠.٩	

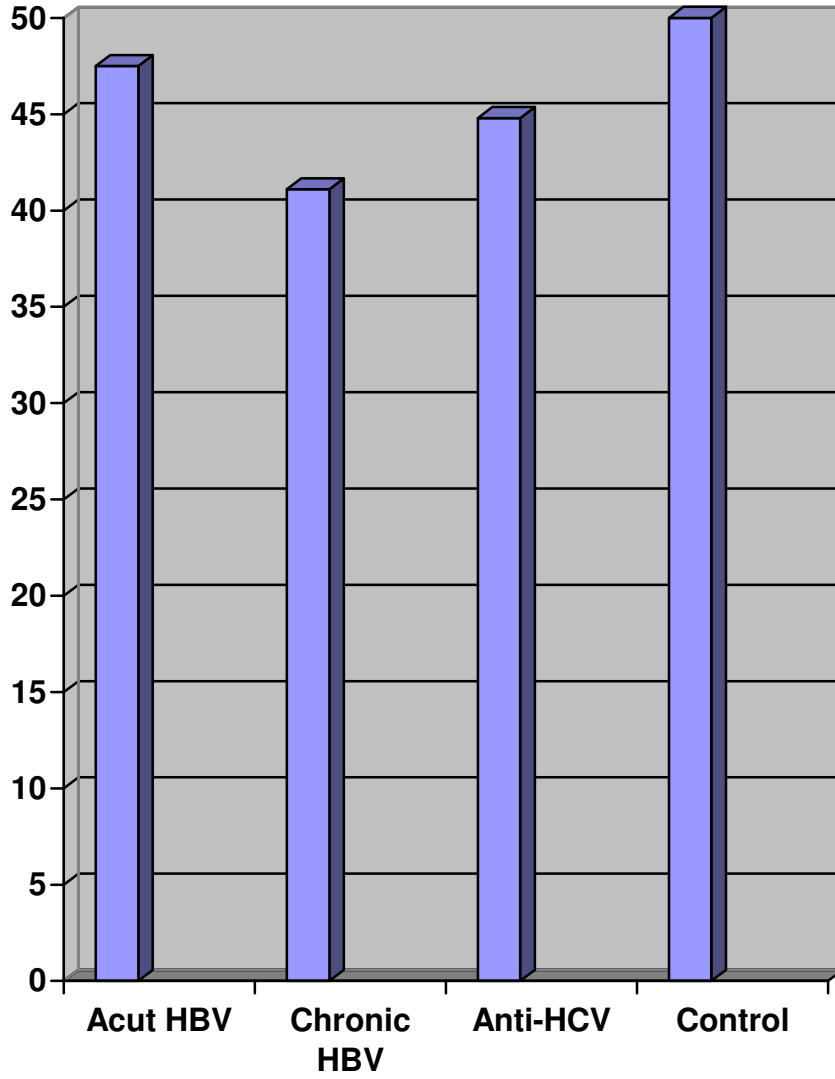
جدول (٢) : مستوى الكلوبولين المناعي IgM mg/dl بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة.

Group s NO	Acute HBV	Chronic HBV	Antic HCV	Control
1	239.8	212.9	229.0	٢٧٢.٠
2	370.5	229.0	383.4	٢٩٦.٥
3	647.0	479.1	647.0	٥٠.٤
4	479.1	218.4	508.0	١٢١.٩
5	383.4	207.9	296.5	٣٤٥.١
6	647.0	239.8	٦٣٠.٩	٢٢٩.٠
me an	±٦٧.٨٦ ٤٦١.١	±٤٤.٠٦ ٢٤٩.٤	±٧٢.٥٨ ٤٤٩.٢	±٣١.٤٥ ٢١٨.٩
X ²	X ² =٣٥.١	X ² =٢٥.٨	X ² =٣٠.٤	

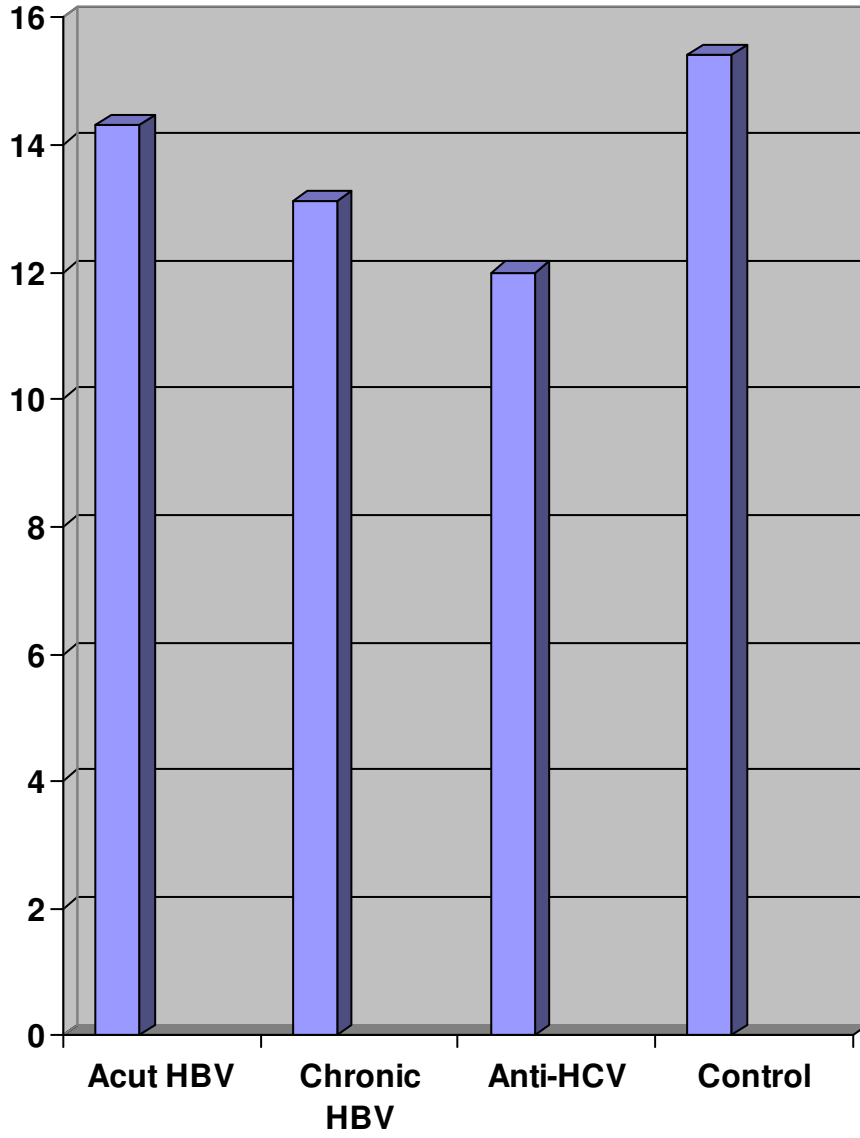
جدول (٣) : مستوى الكلوبولين المناعي IgA mg/dl بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة.



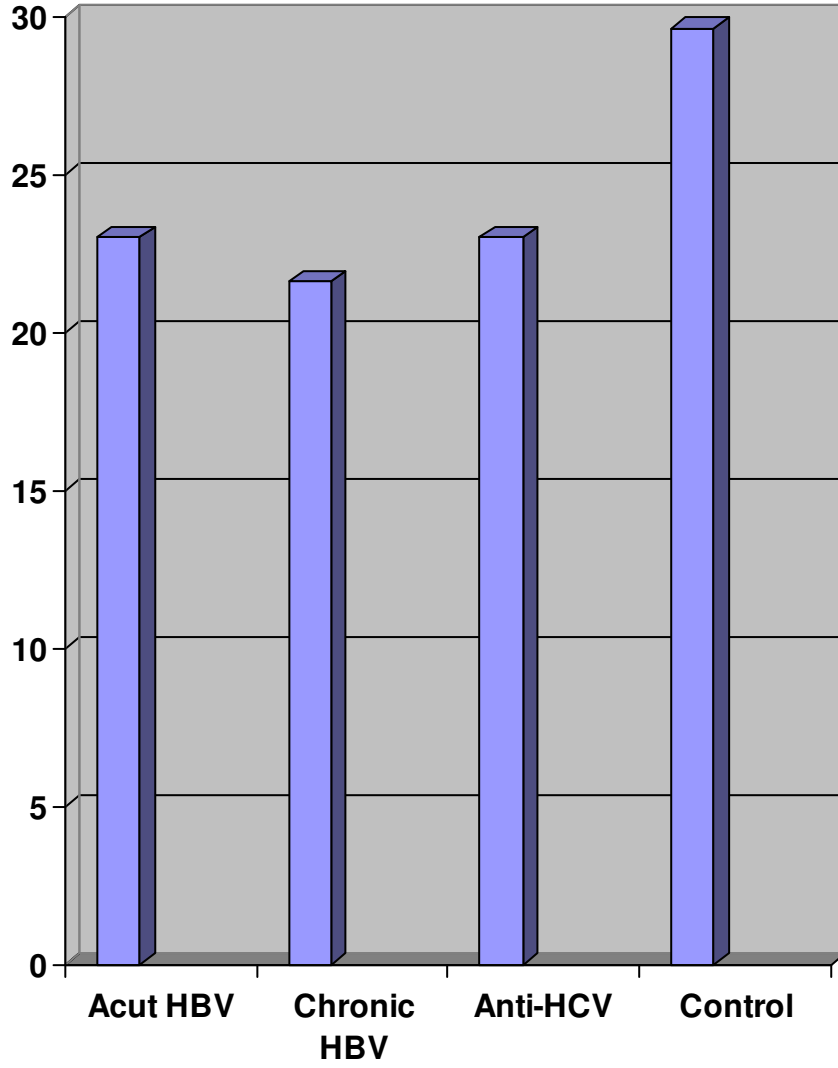
شكل (1) : النسبة المئوية للعدد الكلي لكريات الدم البيض بين المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة .



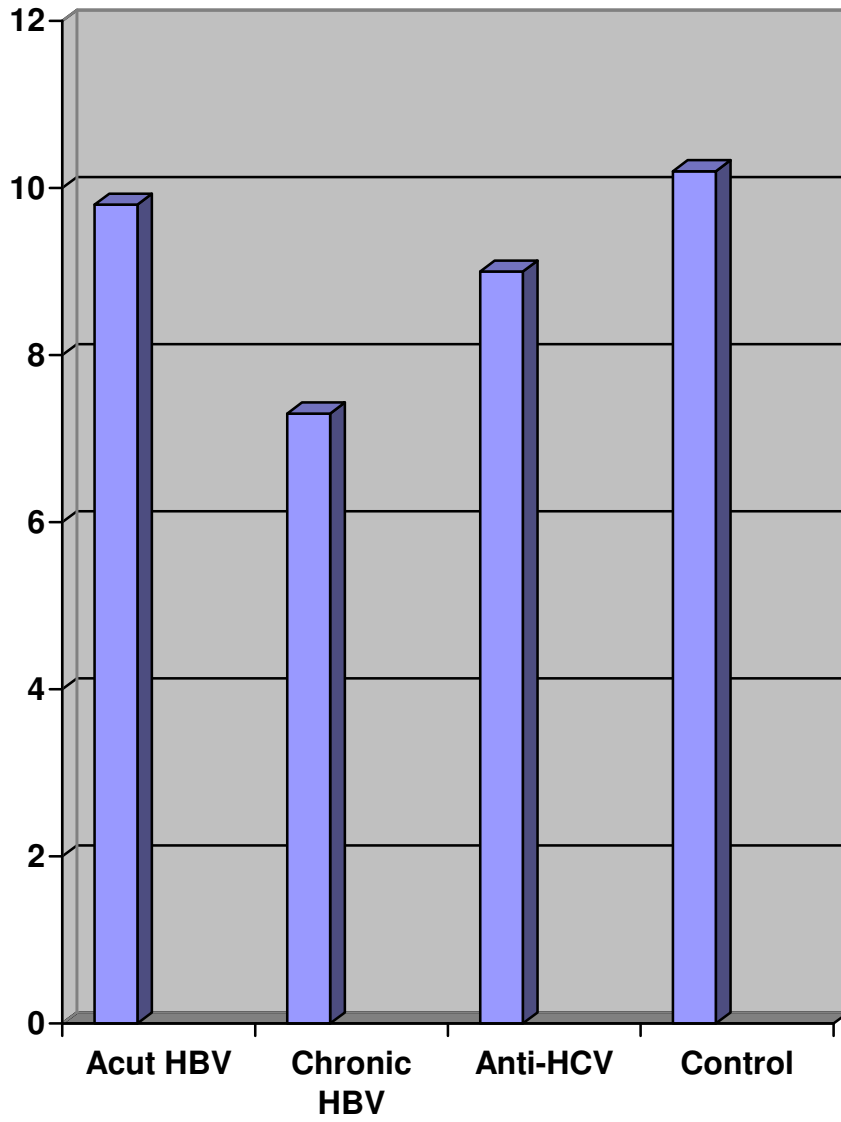
شكل (٢) : النسبة المئوية للعدد الخلايا العدلة Neutrophils بين المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة .



شكل (٣) : النسبة المئوية للعدد الخلايا القعدة Basophils بين المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة .



شكل (٤) : النسبة المئوية للعدد الخلايا اللمفية Lymphocytes بين المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة .



شكل (٥) : النسبة المئوية للعدد الخلايا وحيدة النواة Monocytes بين المصابين بالتهاب الكبد لفيروسي ومجموعة السيطرة .

مناقشة النتائج:

مستوى الكلوبولينات المناعية في مصول مرضى التهابات الكبد الفيروسيّة
ومجموعة السيطرة :

تم التحري عن مستوى الأضداد IgA, IgM, IgG ومستوى المتمم C₃, C₄ لمرضى التهاب الكبد الفيروسي فقد تم تقسيمها إلى ثلاث مجاميع وبالشكل التالي المجموعة الأولى شملت (٦) اشخاص مصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمجموعة الثانية شملت (٦) اشخاص مصابين بالتهاب الكبد الفيروسي B المزمن والمجموعة الثالثة فشملت (٦) اشخاص حاملين Anti-HCV حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة لمستوى الكلوبولين المناعي صنف IgG لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن مرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة وجود ارتفاع معنوي ملحوظ مقارنة بمجموعة السيطرة $t=67.3, p<0.05, t=15.7, p<0.05$ وبمعدل $127.5\pm 238.5, 2164.9\pm 303.3, 1139\pm 218.9$ على التوالي. كما أظهرت نتائج هذه الدراسة لمستوى الكلوبولين المناعي IgM لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة فقط لوحظ ارتفاع معنوي مقارنة مع مجموعة السيطرة $t=29.5, p<0.05, t=9.20, p<0.05, t=28.3, p<0.05$ وبمعدل $13.1\pm 20.33, 225.8\pm 30.60, 131.8\pm 23.52, 240.2\pm 46.39$ على التوالي. أما مستوى الكلوبولين المناعي IgA لمرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة فقد كان هنالك ارتفاع معنوي ملحوظ بين الإصابة ومجموعة السيطرة $t=35.4, p<0.05, t=5.6, p<0.05$ وبمعدل $218.9\pm 31.45, 449.2\pm 72.58$ على التوالي، و $t=38.6, p<0.05$ على التوالي. وقد جاءت هذه النتائج موافقة للنتائج التي حصل عليها (Harris C, 1990) خلال دراسته عن مستوى الكلوبولينات المناعية بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي الحاد Acute والمزمن chronic ومجموعة السيطرة control حيث وجد أن هنالك ارتفاع معنوي ملحوظ لمستوى الكلوبولين المناعي IgA, IgG ولكنه لم يجد أي فرق معنوي ملحوظ في مستوى الكلوبولين المناعي IgM مقارنة بمجموعة السيطرة.

حساب العدد الكلي لكريات الدم البيض في مصل مرضى التهاب الكبد الفيروسي
ومجموعة السيطرة :

تم حساب العدد الكلي لكريات الدم البيض Total W.B.Cs بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة. فقد وجد أن هنالك انخفاضاً معنوياً ملحوظاً في التعداد الكلي لكريات الدم البيض بين المصابين مقارنة بمجموعة السيطرة $t=15.0, p<0.05, t=14.70, p<0.05$ وبمعدل $74\pm 4.6, 50\pm 3.2, 49\pm 4.4, 56\pm 4.8$ على التوالي، و $t=16.0, p<0.05$ على التوالي شكل (١).

حساب عدد خلايا Neutrophil, Basophil, Monocytes, Lymphocytes
في مصل مرضى التهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة :

نلاحظ في شكل (٢) نجد انخفاضاً معنوياً ملحوظاً في عدد خلايا العدلات بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن مرضى Anti-HCV مقارنة بمجموعة السيطرة $t=2.25, p<0.05, t=6.62, p<0.05, t=12.83, p<0.05$ على التوالي، وبمعدل $50\pm 1.1, 44.8\pm 0.9, 41.1\pm 0.3, 47.5\pm 1.3$ على التوالي. كما تم حساب عدد خلايا القعدة بين مرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة. فقد كانت بمعدل $15.4\pm 0.5, 14.3\pm 0.2, 13.8\pm 1.1, 12\pm 0.9$ على التوالي. وقد أظهر التحليل الإحصائي $t=4.94, p<0.05, t=2.16, p<0.05,$ وجود فروق معنوية ملحوظة في أعداد هذه الخلايا بين المصابين مقارنة بمجموعة السيطرة. شكل (٣).

يوضح الشكل (٥) انخفاضاً في عدد الخلايا وحيدة النواة الدموية Monocytes عند مرضى التهاب الكبد الفيروسي الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV مقارنة بمجموعة السيطرة فقد كانت بمعدل $10.2\pm 0.3, 9\pm 0.6, 7.3\pm 0.4, 9.8\pm 0.4$ على التوالي. وقد أظهر التحليل الإحصائي $t=2.4, p<0.05, t=6.4, p<0.05, t=7.6,$ أن الانخفاض معنوي بين المصابين ومجموعة السيطرة.

إن المستويات المنخفضة لأعداد الخلايا Monocytes, Neutrophil في الإصابات الفيروسية هذه يعود إلى وجود الدنا الفيروسي viral DNA داخل هذه الخلايا وربما يتضاعف فيها (Hoar, 1995) (Isbister, 1994) إن الإصابات الفيروسية هي أحد أهم العوامل المسببة لقلة كريات الدم البيض Leukopenia.

تم حساب عدد الخلايا اللمفية Lymphocytes عند مرضى التهاب الكبد الفيروسي B الحاد والمزمن ومرضى Anti-HCV ومجموعة السيطرة فقد كانت بمعدل $29.6\pm 0.6, 23\pm 0.2, 21.6\pm 0.29, 23\pm 1.2$ على التوالي. شكل (٤). وقد أظهر التحليل الإحصائي $t=16.0, p<0.05, t=8.80, p<0.05, t=13.20, p<0.05$ على التوالي. وفي دراسة أخرى تم حساب نسبة عدد الخلايا اللمفية Lymphocytes في مرضى التهاب الكبد الفيروسي الحاد والمزمن فقد كانت بمعدل $44.25\pm 6.4, 49.83\pm 5.64$ على التوالي وأن هنالك انخفاضاً معنوياً .

References:

- Alter, M.J., Gerety R.. (1982) Sporadic non-A, non-B hepatitis: Frequency and epidemiology in an urban U.S. population. *J. Inf. Dis.*, 145: 86-93.
- Abuaf, N., Lunel ,F., Giral,P., Borotto ,E., Laperche ,S., Poupon, R., Opolon P., Huraux ,J, and Homberg J.C.(1993) non organ specific auto antibodies associated with chronic hepatitis C virus. *J. Hepatol.*, 18: 359-364.
- Basher,R.(2001)Serological study of viral hepatitis B .Thesis,College of science.Baghdad university.
- Beasley, R.,, Hwang, L., and Lin,C..(1982) Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J. Inf. Dis.*, 9: 146-158.
- Bradly ,D. (1988) Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non B hepatitis. *J. Virol.*, 69: 731-738.
- Burgana ,D, Alter, H., Forsberg, A. and Levine ,P (1990) Prevalence of hepatitis C virus antibodies in hemophilia patients. *J. Virol.*, 76: 254-256.
- Choo ,Q., Kuo, G., Donato ,M., Ninno, E. and Tommasini ,M. (1989) Prevalence of antibodies of hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *J. Virol.*, 32: 602-610.
- Chretien ,P. and Johanet, C. (1992) Autoantibodies with chronic active hepatitis. *Hepatology.*, 8: 1662-1669.
- Dienstage ,E., Sterneck, M., Gunther ,S., Gerlach ,J.(1980) Hepatitis B virus sequence changes evolving in liver transplant recipient with fulminant hepatitis . *J. Hepatol*; 26:754-64 .
- Frangeul,L., Gbuaf, N. and Lunel ,F. (1992) Liver kidney and hepatitis C virus infection. *Hepatology.*, 16: 360-366.
- Giusti,G.,andGalantiB. (1984) Adenosin deaminase: Colorimetric method. Academic Press, New York. 315-323.
- Glaser, J.B. and Greifinger R.B. (1993) Correctional health care: public health opportunity. *Ann. Intern. Med.*, 118: 139-145.
- Gold stein S.T. and Williams I.T. (2002) Incidence and Risk Factors for hepatitis C in the united. *J. Inf. Dis.*, 185: 713-719.
- Gonsalves D. (1993) Hepatitis B virus. *J. Infect.*, 13(suppl A): 31-38.
- Harris,C.,Neiva,S.,Renato,R.and Regina,C.(1990)Hepatitis B virus immunoglobulin antibody in different population in Barasil. *Clin. Immunol.* 7:813-816.
- Herd K., Schwingl P.J. and werner B.G. (2000) Prevalence of markers for hepatitis B and hepatitis D in municipal house of correction. *CMR. Med.*, 80: 47-53.
- Hoar, K., and Keneth,S.(1995)HepatitisCvirus core protein leading toimmune suppression and liver damage. *J. Virul.* 76:9435-9445.
- Jaff J.S., Eisenstein E, Sneller M.C. and Strober W. (1993) T-cell abnormality in common variable immune deficiency. *Pediatr. Rec.*, 1: 24-28.
- Kasper C.K. and Kipnis S.A. (1993) Hepatitis and clotting factor concentration. *J. Am. Med.*, 7: 97-105.
- Liag T. J. Hasegawak. and Rimon N. (1991) Hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *Engl. J. Med.*, 324: 1705-1709.
- Lincoln T., Flanigan T.P. and Conklin T.J. (1998) Public health model to connect correctional health curve with communities. *J. public health*, 88: 29-50.
- Lok A.S. and Mc Mahon B.J. (2001) Hepatocellular carcinoma FEBS letters, 49: 82-86.
- Martini E., cavalli F., Johanet C. and Homberg J. (1988) Antibodies to liver cytosol in patients with chronic active hepatitis. *Hepatology.*, 16: 829-898.

- Mazoalini I., Kruger M., Bocker W. (1994) Treatment of hepatitis B related polyarteritis nodosa with famcyclovir and interferon alfa. *J. Hepatol*; 26:935-9.
- Mc Hutchinson J.G., Gordon S.C. and Schiff E.R. (1998) Interferon α -2b in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *Engl. J. Med.*, 339: 1485-1492.
- Nagamin T., Ohtuka T., Takehara K., Arai T., Takagi H. and Mori M. (1996) Thrombocytopenia associated with hepatitis C. *J. Hepatol.*, 24: 135- 140.
- Ockenge J., Zanetti A., Tanizi G. (1997) prevalence of hepatitis B marks in children vaccinated by hepatitis vaccine. *J. clin. Virol.*; 9: 17-23.
- Pinar, A. and Kaura T. (1998) Incidence and duration of HBsAg in Turkey. *J. Inf. Dis.*, 31: 67-69.
- Rafael R. (1996) Acute liver failure. *N.Engl. Med*; 329:1862-72.
- Rogress A.S., Lindsey J.C. and Futterman D.C (2003) serological examination of hepatitis B infection and immunization in HIV-positive youth and associated risks. *STD.*, 14:651-657.
- Ruis J., sangro B., Cuende J. Belouqui O., Herrero J. and priego J. (1992) Hepatitis B and C virals infecting inpatients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 16: 637-641.
- Shapiro W., Govindarajan S., Chin K.P., Redrick A.G. (1995) Fulminant B viral hepatitis. *Gastro*, 86:1417-20.
- Shafritz D.A., Held M.J., Holander H.H., (1992) Hepatitis B in patients with HIV infection. *Ann Intern. Med*; 117:837-8.
- Vega P.R., planas V.R., durandez, L.R. and Fabrigas. P.S. (2000) Acute hepatitis C: Response to treatment with interferon-alpha plus ribavirin. *Gastro. Hepatol.*, 25: 483- 486.
- William M. (1999) Epidemiology of hepatitis B virus infection. *Saudi. Med. J.*, 24: 1733- 1739.
- Wolinsky. S. and Zhair J.P. (1989) Diagnosis of infection with the hepatitis B virus. *J. inf. Dis.*, 159: 320- 322.
- Woodruff B.A., Moyer L.A. and Margolis H.S. (2001) Blood exposure and risk of hepatitis B virus infection in firefighters. *MMWR.*, 35: 1-18