3. المجاميع ، المواد وطرائق العمل
Subjects, Materials and Methods

3 . 1. مجاميع الدراسة:

3 . 1 . 1. مجموعة المرضى المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي نمط (B) الحاد:
Acute hepatitis B group

شملت هذه المجموعة المرضى الذين يعانون من التهاب الكبد الفيروسي نمط (B) الحاد. تم اختيارهم من خلال مراجعتهم لوحدة الفيروسات في مختبر الصحة العامة في بعقوبة بعد ارسالهم من قبل الاطباء الاختصاصيين في العيادة الاستشارية لمستشفى عام بعقوبة وكذلك من مختلف مستشفيات المحافظة ومراكزها الصحية، اعتمادا على الاعراض السريرية الظاهرة عليهم. للتأكد من اصابتهم بأحد انماط التهاب الكبد الفيروسي، حيث ثبت اصابتهم بالتهاب الكبد الفيروسي نمط (B) الحاد عن طريق وجود المستضد السطحي لالتهاب الكبد الفيروسي نمط (B) (HBsAg) والضدات النوعية للب الفيروسي (Anti-HBcIgM) في امصالهم.

وقد أعتُمدت استمارة خاصة تضمنت معلومات خاصة عن المريض منها العمر، الجنس والسكن كما هو واضح بالملحق رقم (1) . حيث كان عدد المرضى (68) ذكور بمعدل عمر (26.2 ± 15.4 سنة) و(37) اناث بمعدل عمر (27.2 ± 17.6 سنة) من مناطق مختلفة من المحافظة.

3. 1. 2. مجموعة المرضى الحاملين لفيروس التهاب الكبد الفيروسي نمط (B) :
Chronic hepatitis B carriers group

شملت المجموعة الاشخاص الحاملين Carriers لفيروس التهاب الكبد نمط (B). وقد تم اختيار هذه المجموعة من :

1. متبرعي الدم في مصرف الدم الرئيس لمختبر الصحة العامة في بعقوبة. الذين ثبت وجود المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) HB_sAg في امصالهم.
2. ملامسيهم من الاهل والاقارب او زملائهم في العمل الذين ثبت وجود المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) في امصالهم.

3. الايجابيين للمستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) من خلال مراجعتهم الدورية لوحدة الفيروسات لمتابعة حالتهم المصلية، وذلك بعد ارسالهم من قبل الطبيب الأخصائي وقد اعتمدت استمارة خاصة اعدت لهذا الغرض تضمنت معلومات عن العمر، الجنس والسكن كما هو واضح في الملحق رقم (1) وقد كان عدد الذكور (69) وبمعدل عمر (32.4 ± 11.8 سنة) والاناث (36) بمعدل عمر (35.2 ± 12.2 سنة) .

3. 1. 3. مجموعة الاشخاص الاصحاء: Healthy control group

شملت هذه المجموعة (117) شخصاً من الاصحاء ظاهرياً الذين ثبت خلو امصالهم من المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) HB_SAg negative . اختيروا بشكل عشوائي في اثناء مراجعتهم وحدة الفيروسات في مختبر الصحة العامة/ بعقوبة ، لاجراء فحوصات ما قبل الزواج. وكذلك من متبرعي الدم في مصرف الدم الرئيس، حيث كان عدد الاناث (57) بمعدل عمر (23.2 ± 5.9 سنة) وعدد الذكور(60) بمعدل عمر (28.7 ± 5.9 سنة) .

3. 1. 4. عملية سحب الدم وحفظه:

سحبت (5−10) مللتر من الدم الوريدي للأشخاص الأصحاء والمرضى المشمولين بالدراسة. وذلك بعد وضع الكفوف وتعقيم منطقة سحب الدم بالكحول الاثيلي (70%)، بعدها عقمت المنطقة نفسها بمحلول اليود (2%). وباستعمال محاقن طبية نبيذة سحب الدم ووضع في انابيب مختبرية نبيذة مع مراعاة رمي المحاقن المستعملة من دون اعادة الاغطية عليها في حاويات خاصة والتي ارسلت بدورها الى المحرقة للتخلص منها.

ترك الدم لمدة (10−15) دقيقة في درجة حرارة الغرفة لحين حدوث التجلط Clotting. فصل المصل باستعمال جهاز الطرد المركزي Centrifuge بمعدل 3000 دورة/دقيقة لمدة (5) دقائق. ووزع المصل في انابيب مختبرية نبيذة بمعدل (250) مايكروليتر لكل انبوب اختبار. بعدها حفظت الامصال في درجة حرارة (20−) مئوية لحين اجراء الاختبارات اللازمة عليها.

3. 2. المـــــــــــواد: Materials

3. 2. 1. الادوات والاجهزة المستخدمة:

خلال مدة الدراسة استخدمت الادوات والاجهزة المدونة في القائمة ادناه :

جدول (3. 1) الاجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة

ت	اسم الاداة او الجهاز	المنشأ
1	ماصات دقيقة باحجام مختلفة Micropipettes	Oxford (U.S.A)
2	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hettich, Universal (Germany)
3	فرن كهربائي Oven	Memmert (Germany)
4	حاضنة كهربائية Incubater	Termaks (Germany)
5	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	Payer (Irland)
6	منظومة فحص الاليزا ELISA System وتتكون من:	
A	الغاسل Microwell system washer	Organon/ teknika (Austria)
B	القارئ الالي Microwell system Reader	Organon/ teknika (Austria)
C	طابعة اوتماتيكية Printer	Olivatti (Italy)
7	مجهر ضوئي Light Microscope	Olympus (Japan)
8	هزاز Shaker	Kar/Klob – U.K
9	مجمدة (-20^0c) Deep Freezer	Electro Lux (Denmark)
10	انابيب زجاجية Glass tubes	Monoject/sterlize (U.S.A)
11	انابيب بلاستيكية نبيذة Plastic plane tubes	
12	أسلة بمختلف الاحجام Different size Tips	
13	محراك Stirrer	

3. 2. 2. العدد التشخيصية والمحاليل المستعملة : Reagents & diagnostic kits

جدول (3. 2) العدد التشخيصية والمحاليل المستعملة في الدراسة

ت	اسم العدة التشخيصية	المنشأ
1	Total & Dirct Bilirubin-kit	Bio maghreb (Marrocco)
2	Alkaline phosphotase –kit	Bio merieux (France)
3	Alanine aminotransferase–(ALT-kit)	Randox (U.K)
4	Aspartate aminotransferase–(AST-kit)	Randox (U.K)
5	Total Protein-kit	Randox (U.K)
6	Rheumajet CRP-kit	Biokit (Spain)
7	Bioelisa HB_SAg-kit	Biokit (Spain)
8	Bioelisa anti-HBcIgM	Biokit (Spain)

3. 3. طرائق العمل: Methods

3. 3. 1. اختبارات وظائف الكبد: Liver function tests

3. 3. 1. 1. قياس البليروبين الكلي في مصل الدم: Total serum Bilirubin

تـــم قيـــاس البليـــروبين الكلـــي فـــي الـــدم باســـتخدام العـــدة التشخيصـــية (Total & Direct Bilirubin-kit) (Doumas and Wu, 1991).

3. 3. 1. 1. 1. مبدأ الفحص:

يتفاعل حامض السلفانيلك Sulfanilic مع نترات الصوديوم $NaNo_3$ ليكون حامض دايزوتيزد سلفانيلك Diazotized Sulfanilic. بوجود ثنائي مثيل السلفوكسيد Diamethyl Sulfoxid ، البليروبين الكلي Total Bilirubin يتفاعل مع حامض دايزوتيزد سلفانيلك ليكون ازوبليروبين azobilirubin والذي يعطي لونا ورديا يمكن قياسه في جهاز المطياف على الطول الموجي (555) نانوميتر. كمية البليروبين الكلي الموجودة في المصل تتناسب طردياً مع شدة اللون الناتج.

في غياب ثنائي مثيل السلفوكسيد، فأن البليروبين المباشر Direct Bilirubin وحده يتفاعـــل مـــع حـــامض دايزوتيـــزد ســـلفانيلك Sulfanilic Diazotized ليكـــون آزوبليروبين(azobilirubin).

3. 3. 1. 1. 2. طريقة العمل:

1. تحضير المحلول القياسي (standard solution):

يحضر المحلول القياسي بإضافة (3) مللتر من الماء المقطر الى قنينة المحلول القياسي (standard) ترك لمدة (15) دقيقة، بعدها ذوبت المكونات بالكامل عن طريق قلب القنينة عدة مرات بلطف دون رجها ثم حساب العامل التقويمي (العياري) (Calibration factor) بحسب المعادلة أدناه:-

$$F = \frac{\text{Std. Total or Std. Direct Bilirubin concentration}}{\text{Abs. Standard} - \text{Abs. Std. Blank}}$$

حيث ان :-

F = Calibration factor
Std. = Standard
Abs. = Absorbance

2. تحضير محلول العمل (Working solution):

حضـــــر محلـــــول العمـــــل بمـــــزج (20) حجـــــم مـــــن كاشـــــف (Sulfanilic acid, Hydrochloric acid, Dimethyl Sulfoxids) مع حجم واحد من كاشف (Sodium nitrite). هذا عند قياس البليروبين الكلي. اما عند تحضير محلول العمل لقياس البليـــروبين المباشـــر فيـــتم اتبـــاع الخطـــوات نفســـها أعـــلاه مـــع اســـتبدال الكاشـــف (Sufanilic acid, Hydrochloric acid, Dimethyl Sulfoxide) بكاشـــف (Sufanilic acid, Hydrochloric acid).

3. 3. 1. 1. 2. a. البليروبين الكلي (Total Bilirubin):

1. وضع (50) مايكروليتر من مصل العينة المراد اختبارها في انبوبة الاختبار.
2. اضيف (1) مللتر من محلول العمل الى انبوبة الاختبار.
3. مزجت المكونات جيدا وحضنت لمدة (5) دقائق تحت درجة حرارة (37) مئوية.

4. قُرأت الامتصاصية لكل من انبوبتي الاختبار (Test) والقياسي (Standard) مقابل البلانك (Blank) التابع لهما بواسطة جهاز المطياف على الطول الموجي (555) نانوميتر.

3. 3. 1. 1. 2. b . البليروبين المباشر Direct Bilirubin:

اعتُمدت خطوات العمل نفسها المتبعة في قياس البلروبين الكلي ما عدا استخدام محلول العمل الخاص بفحص البليروبين المباشر.

اعتمدت المعادلة في أدناه لحساب البليروبين الكلي (Total) او المباشر (Direct)

$$\text{Total or Direct Bilirubin} = \frac{\text{Abs. (A) sample}}{\text{Abs. (A) Standard}} \times \text{std. Con.}$$

حيث ان :-

Abs. = Absorbance
Std. Con. = Standard concentration

الحدود الطبيعية للفحص: (Brounwald et al., 2001)

البليروبين الكلي: 0.2 .1 ملغرام/ 100 مللتر

البليروبين المباشر: 0.0 . 0.2 ملغرام/ 100 مللتر

3 . 3 . 1 . 2. قياس فاعلية أنزيم الفوسفتيز القاعدي (Alkaline phosphatase) في المصل:

قيست فاعلية انزيم (Alkaline phosphatase) في مصل الدم باستخدام العدة التشخيصية (phosphatase alkaline-kit) (Tietz et al., 1983).

3 . 3 . 1 . 2 . 1. مبدأ الفحص:

تم قياس الشدة اللونية لفاعلية انزيم (Alkaline phosphatase) على وفق التفاعل الآتي:

$$\text{Phenyl phosphate} \xrightarrow[\text{PH 10}]{\text{Alkaline phosphatase}} \text{phenol} + \text{phosphate}$$

حيث قيس الفينول المتحرر بوجود (amino-4-antipyrine) و (Potassium Ferricyanide).

وجود زرنيخ الصوديوم (Sodium arsenate) في الكاشف يوقف التفاعل الانزيمي. والذي يعطي لونا بنيا يمكن قياسه في جهاز المطياف على الطول الموجي (510) نانوميتر، الشدة اللونية الناتجة متناسبة طرديا مع كمية الانزيم في مصل الدم

3 . 3 . 1 . 2 . 2. طريقة العمل:

1. اخـــــذت (2) مللتـــــر مـــــن الكاشـــــف Substrate buffer (Disodium phenylphosphate, carbonate-bicarbonate buffer PH 10, sodium merthiolate) ووضعت في انابيب اختبار العينة (test) والقياسي (standard) وبلانك الكاشف (Reagent blank) وبلانك العينة (serum Blank) على التوالي.
2. حضنت الانابيب لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة (37) مئوية.
3. اخرجت الانابيب من الحاضنة، واضيف (50) مايكروليتر من مصل العينة المراد فحصها في انبوبة اختبار العينة (test)، و (50) مايكروليتر كاشف standard (phenol) في انبوبة القياسي.
4. حضنت الانابيب لمدة (15) دقيقة تحت درجة حرارة (37) مئوية
5. اضيف (0.5) مللتر من كاشف inhibiter (4-aminoantipyrine, sodium arsenate) الى انابيب الاختبار:- انبوبة اختبار العينة (serum sample)، انبوبة القياسي (standard)، انبوبة بلانك مصل العينة (serum Blank) وانبوبة بلانك الكاشف (Reagent blank) على التوالي ، مزجت المواد جيدا. وحركت بشكل دوامة (Vortex)
6. اضيف (0.5) مللتر من الكاشف colorreagent (potassium ferricyanide) لجميع انابيب الاختبار المذكورة اعلاه. ثم اضيف (50) مايكروليتر من مصل العينة الى بلانك العينة (serum Blank) و (50) مايكروليتر ماء مقطر (Distilled water) الى بلانك الكاشف ، مزجت المكونات وتركت لمدة (10) دقائق في مكان مظلم.
7. قرأت الامتصاصية العينة (sample) والقياسي (standard) مقابل البلانك (blank) التابع لهما بواسطة جهاز المطياف على الطول الموجي (510) نانوميتر.

8. قيست فاعلية الانزيم على وفق المعادلة في أدناه:

$$\text{Calculation of activity} = \frac{\text{ODserum sample-ODserum blank}}{\text{ODstandard}} \times n$$

حيث ان:

OD = Optical density
n = Standard concentration: 142U/L

الحدود الطبيعية للفحص: (Thomas, 1998)

Children = 71-142 U/L
Adult = 21-92 U/L
U/ L = Unite / Liter

3 . 3 . 1 . 3. قيـــاس فاعليـــة انـــزيم الانـــين امينـــو ترانســـفيريز Alanine aminotransferase في المصل:

قيست فاعلية انزيم (Alanine aminotransferase) في المصل باستخدام العدة التشخيصية (ALT-kit) (Witt and Trendelenburg, 1982).

3 . 3 . 1 . 3 . 1. مبدأ الفحص:

قيست فاعلية انزيم (ALT) بواسطة تنظيم تركيز بايروفيت هايدرازون (Pyruvate hydrazone) المتكـــون مـــع 4، 2- ثنـــائي نايتروفنيـــل الهايـــدرازين (2,4-dinitropheny-hydrazine) والذي يعطي لونا بنيا يمكن قياسه بواسطة جهاز المطياف على الطول الموجي (540) نانوميتر حيث تناسب الش[illegible] مع كمية الانزيم في المصل.

$$\alpha\text{-Oxoglutarate} + \text{L-alanine} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{L-glutamate} + \text{Pyruvate}$$

3 . 3 . 1 . 3 . 2. طريقة العمل:

1. اخذت (0.1) مللتر من مصل العينة المراد اختبارها ووضعت في انبوبة اختبار العينة (test).

2. أضـــــيف (0.5) مللتـــــر مـــــن المحلـــــول المعـــــدل Buffer (Phosphat buffer, L- alanine, α - Oxoglutrate) الى انبوبة اختبار العينة (test). مزجت المواد، وحضنت لمدة (30) دقيقة تحت درجة حرارة (37) مئوية.
3. اضيف (0.5) مللتر من المحلول الملون (2,4-Dinitrophenyl hydrazine) للانبوبة نفسها.
4. مزجت المواد وتركت لمدة (20) دقيقة في درجة حرارة الغرفة (20−25) مئوية.
5. اوقف التفاعل باضافة (5) مللتر هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.9% N).
6. مزجت المواد وقرأت الامتصاصية مقابل بلانك العينة بعد(5) دقائق على الطول الموجي(540) نانوميتر.
7. جرى احتساب فاعلية انزيم(ALT) في مصل الدم من الجدول الملحق بالعدة التشخيصية اعتمادا على قراءة عينة الاختبار.

الحدود الطبيعية للفحص: (Haslett et al., 2002)

Up to 12 U/L

3 . 3 . 1 . 4. قيـــاس فاعليـــة انـــزيم الاســـبارتيت امينـــو ترانســـفيريز Aspartate aminotransferase في المصل:

قيســـت فاعليـــة انـــزيم(Aspartate aminotransferase) باســـتعمال العـــدة التشخيصية(AST-kit) (Johnson et al., 1995).

3 . 3 . 1 . 4 .1. مبدأ الفحص:

قيســت فاعليــة انــزيم (AST) بواســطة تنظــيم تركيــز اوكزالواســتيت هايــدرازون (Oxaloacetate hydrazon) المتكون مع 2و4− ثنائي نايتروفنيل هايدرازين (2,4-Dinitrophenyl hydrazon) الذي يعطي لونا بنيا يمكن قياسه بواسطة جهاز المطياف على الطول الموجي (540) نانوميتر، تناسب الشدة اللونية مع كمية الانزيم في المصل.

$$\alpha\text{-Oxoglutarate} + \text{L-aspartate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{L-glutamate} + \text{Oxaloacetate}$$

3 . 3 . 1 . 4 . 2. طريقة العمل:

1. اتبعت خطوات العمل نفسها لقياس فاعلية انزيم (ALT) اعلاه باستثناء استعمال المحلول المعدل (Phosphate buffer, L- aspartate, α -oxglutarate) الخاص بالعدة التشخيصية لفحص انزيم (AST).
2. قرات الامتصاصية ضد بلانك العينة على الطول الموجي (540) نانوميتر
3. احتسبت فاعلية الانزيم من الجدول الملحق بالعدة التشخيصية اعتمادا على قراءة العينة.

الحدود الطبيعية للفحص: (Moss and Henderson, 1999)

Up to 12 U/L

3 . 3 . 1 . 5. قياس تركيز البروتين الكلي:

Determination of Total serm protein

تم قياس تركيز البروتين الكلي(Total serum protein) في الدم باستعمال العدة التشخيصية (Total protein-kit) (Doumas et al., 1981).

3 . 3 . 1 . 5 . 1 مبدأ الفحص:

ايونات النحاس (Cupric ions) في الوسط القاعدي تتفاعل مع الاواصر الببتيدية للبروتين متسببة في تكوين معقد لوني بنفسجي يمكن قياسه بوساطة جهاز المطياف على الطول الموجي (550) نانوميتر. ان الشدة اللونية تتناسب مع تركيز البروتين الكلي في مصل الدم.

3 . 3 . 1 . 5 . 1. طريقة العمل:

أ. تحضير المحاليل:

حضـــــــــــــــــ

مللتر من ماء مقطر مرتين وقد علمت محاليل الكواشف بمحلول (1) لكاشف (Biuret) ومحلول (2) لكاشف (Blank) على التوالي.

ب- طريقة عمل الفحص:

1. أخذت (0.02) مللتر من مصل العينة. ووضعت في انبوبة اختبار.
2. أضيف (1) مللتر من محلول (1).
3. مزجت المواد. وحضنت لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (20-25) مئوية.
4. قرأت الامتصاصية لانبوبتي اختبار العينة (test) والقياسي (standard) مقابل بلانك الكاشف (محلول2) على التوالي.
5. احتسب تركيز البروتين الكلي على وفق المعادلة في أدناه:

$$\text{Total protein concentration} = \frac{\text{A Sample}}{\text{A Standard}} \times \text{standard concentration}$$

الحدود الطبيعية للفحص: **(Painter et al., 1999)**

1. Adults = 6.6-8.7 g/dl
2. Children up to 6 years = 5.6-8.5 g/dl
3. Neonates = 5.3-8.9 g/dl

2.3.3. قياس عيارية بروتين (C)المنشط في مصل الدم بواسطة عيار التراص لجسيمات لاتكس (Latex):

Determination of C. reactive protein (C-RP) titer in serm by agglulination test:

قيست عيارية بروتين (C)المنشط (C. reactive protein) في المصل باستخدام العدة التشخيصية (Rheumajet (CRP-kit)بطريقة(Semiquantitative agglutination test) (Smith et al., 1977).

1.2.3.3. مبدأ الفحص:

كاشف لاتكس (Latex reagent) هو معلق من جسيمات (Polystyrene Latex) ذات حجم منتظم مغطاة بجزء (Fraction) من الكلوبيولين المناعي (IgG) لمستضد بروتين (C)المنشط الخاص بالمصل البشري. جسيمات لاتكس تسمح بالملاحظة المرئية للتفاعل بين المستضد – الضد (CRP-IgG-anti- CRP).

في حالـة حدوث التفاعـل بسبب وجـود بـروتين (C)المنشـط فـي المصـل، فـان معلـق (Latex) يتلزن بشكل واضح هذا التغير يحدث بسبب وجود بروتين (C)المنشط في المصل والذي يتفاعل مع الكلوبين المناعي (IgG) المغطي لجسيمات (Latex) مكوناً شبكة بينهم.

في حالة احتواء المصل على تركيز اكثر من (6mg/l) من بروتين (C) المنشط (C-RP) فان تلزناً واضحاً سيحدث عند مزجه بكاشف (Latex) .

2.2.3.3. طريقة العمل:

1. وضـعت (50) مـايكروليتر مـن المحلـول الملحـي الفسـلجي (Normal saline) فـي سـتة انابيب اختبار زجاجية (Khan tubes) وتم تعليمها حسب التخـافيف المطلوبـة من انبوبـة الاختبار 1،2،3 ... الخ.
2. اضيف 50 مايكروليتر من مصل العينة المراد فحصها الى انبوبة الاختبار الاولى(1).
3. مزجت المـواد جيداً وذلـك بسـحب وتحريـر المـزيج المتكـون (serum + normalsaline) باستخدام الماصة الاتوماتيكية في انبوبة الاختبار (1).
4. اجريـت عمليـة تخفيـف العينـة وذلـك باخـذ 50 مـايكروليتر مـن المـزيج المعـد فـي انبوبـة الاختبار (1) ونقله الى انبوبة الاختبار رقم (2).
5. كررت عملية التخفيف اعلاه حتى اخر انبوبة اختبار مطلوب تخفيفها ، بعدها تم نبذ 50 مايكروليتر من انبوبة الاختبار الاخيرة ، وبذلك تكونت لدينا التخـافيف التاليـة 1:2،1:4 ، 1:8 ، 1:16 ، 1:32 ، 1:64 ، ..... الخ .
6. أضيف 50 مـايكروليتر مـن كاشـف لاتكس (CRP-Latex reagent) لكل انبـوب اختبـار من انبوب الاختبار (1) الى آخر انبوب تم تخفيفه.
7. مزجت المواد في كل انبوب اختبار بواسطة محراك (Stirrer).
8. دورت أنابيب الطبق لمدة دقيقتين يدوياً .
9. يتم ملاحظة التلزن الحادث ان وجد ، وذلك باخذ قطرة من المزيج الموجود في كل انبوبة اختبار ووضعها على شريحة زجاجية بحيث سلسلت القطرات من اول انبوب اختبار الى اخر تخفيف معمول ، وباستعمال المجهر الضوئي تم ملاحظة التلزن الحادث ان وجد باستخدام قوتي التكبير (10X) و (40X) حيث تم حساب العيارية من خلال التراكيز المرفقة بكل تخفيف في الجدول الملحق بالعدة التشخيصية.

الحدود الطبيعية للفحص: **(Kindmark, 1972)**

0.02 – 13.5 مليغرام / لتر

3.3.3. الكشف عن المستضد السطحي للالتهاب الكبد الفيروسي نمط (B) في مصل الدم باستخدام تقنية الاليزا:

Detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in human serum by Enzyme-Linked immunosorbant assay (ELISA)

تم الكشف عن المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) في المصل بوساطة الاختبار اللوني للاليزا وذلك باستعمال العدة التشخيصية (Bioelisa HB_s Ag-kit) (Voller et al., 1978).

1.3.3.3. مبدأ الفحص:

الاختبار اللوني للاليزا ، هو اختبار انزيمي مناعي مباشر تغطى حفر (microplate titer) من الداخل بأضداد المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) (anti-HBs antibody).

في حالة احتواء المصل المراد فحصه على المستضد السطحي فسيرتبط مع الاضداد المثبتة على السطح الصلب للحفر ، هذه الاضداد مرتبطة بدورها مع انزيم البيروكسدير (Peroxidase) الذي يعمل رابطاً للاضداد. خلال طريقة العمل تحضن العينة (sample) في احدى حفر الطبق لمدة (60 ± 5) دقيقة تحت درجة حرارة (37) مئوية. فاذا احتوت العينة على المستضد (HBsAg) ، فان المستضد سيرتبط مع الضد في الطبق. بعد الغسل، تزال المواد غير المرتبطة يضاف المقترن (Conjugate) الى الحفر ويترك فترة حضانة ثانية لمدة (30 ± 2) دقيقة بدرجة حرارة (37) مئوية ليرتبط مع معقد المستضد – الضد المتكون من الحضانة الاولى بعد ذلك يغسل الطبق ثم يضاف الانزيم المرتبط مع المادة الملونة. المادة سوف تتطور الى لون ازرق اذا احتوت العينة على المستضد (HBsAg). اللون الازرق يتحول الى الاصفر بعد انتهاء التفاعل باضافة (1N) من حامض الكبريتيك (H_2SO_4). الشدة اللونية تتناسب طردياً مع كمية المستضد السطحي الفيروسي للالتهاب الكبد نمط (B) (HBsAg) في العينة.

2.3.3.3. طريقة العمل :

1. نقل 100 مايكروليتر من كل من المنظم (Control) الموجب والسالب الى الحفر المعينة ، حيث تم استعمال 3 حفر للمنظم السالب، وحفرة واحدة للمنظم الموجب وحفرة واحدة للبلانك (Blank) تبقى خالية بدون اضافة.
2. يتم نقل 100 مايكروليتر من المصل من كل عينة اريد فحصها الى الحفر المخصصة لها.
3. غطيّ الطبق بغطاء لاصق وحضن لمدة (60±5) دقائق تحت درجة حرارة (37) مئوية.

4. ازيل الغطاء اللاصق للطبق. شفطت محتويات الحفر وملأت بصورة كاملة بمحلول الغسل المخفف (diluent washing solution) اعيدت عملية الغسل . الشفط ثلاث مرات. بعد اخر غسل، نشف الطبق على نسيج ماص لإزالة اي سائل متبقي في الحفر.
5. اضف 100 مايكروليتر من المقترن لكل حفرة ما عدا البلانك.
6. غطيّ الطبق بغطاء لاصق وحضن لمدة (30±2) دقائق بدرجة حرارة (37) مئوية.
7. خلال الـ(5–10) دقائق الاخيرة من فترة الحضانة الثانية خفف المحلول الملون Tetramethyl benzidine (TMB) مع المادة المعدلة (Substrate buffer).
8. ازيل غطاء الطبق اللاصق. شفطت محتويات الحفر وغسل الطبق كما في الخطوة (4) ثلاث مرات ثم نشف الطبق على نسيج ماص لازالة أي سائل متبقي في الحفر.
9. اضيف 100 مايكروليتر من مادة (TMB – Substrate) لكل حفرة.
10. حضن الطبق غير مغطى لمدة(30± 2) دقائق بدرحة حرارة الغرفة (20–25) مئوية.
11. وُقفَ التفاعل باضافة 100 مايكروليتر من (1N) حامض الكبريتيك في التتابع نفسه والفترات الفاصلة كتلك المستخدمة في الخطوة (9).
12. صُفر القارئ على (450) نانوميتر مقابل حفرة البلانك وقيست الامتصاصية لكل حفرة خلال 30 دقيقة.
13. تم احتساب النتائج على وفق الاتي:–

1. خالي المادة الاساس (Substrate blank):

قيمة الامتصاصية يجب ان تكون اقل أو تساوي 0.100

Substrate blank ≤ 0.100

2. معدل المنظم السالب (NC_X) (Negative control mean):

تم احتساب معدل المنظم السالب (NC_X) من خلال قسمة مجموع القيم الفردية (Individual values) على (3).

$$NCx = \frac{Individual\ Values}{3}$$

على ان تكون كل قيمة من القيم الفردية الناتجة مساوية او اعلى من 0.5 مضروبة في (NC_X) ومساوية او اقل من 1.5 مضروبة في (NC_X) وان أي قيمة خارج هذا المدى تهمل. بحيث اذا خرجت اثنتين من القيم خارج المدى، فيجب اعادة الفحص وحساب المعدل ثانية .

معدل الامتصاصية للمنظمات السالبة يجب ان يكون اقل من 0.120 بعد طرحه من (blank)

$NC_X < 0.120$

3. المنظم الموجب (Positive control):

قيمة الامتصاصية للمنظم الموجب يجب ان تساوي او اعلى من (0.700) بعد طرحها من البلانك

$PC > 0.700$

حساب (Cut-off value):

تم احتساب قيمة (Cut-off) على وفق المعادلة التالية:

$Cut\text{-}off = NC_X + 0.040$

لمعرفة النتائج الموجبة عن السالبة وفق الاتي:

1. اذا كانت نسبة الامتصاصية الى قيمة (Cut-off) اكبر من او تساوي(1.0) فهي موجبة
Positive: ratio absorbance / Cut-off > 1.0
2. اذا كانت نسبة الامتصاصية الى قيمة (Cut-off) اصغر من (0.9) فهي سالبة
Negative : ratio absorbance / Cut-off < 0.9

4.3.3. الكشف عن الضدات النوعية (IgM) للمستضد اللبي لالتهاب الكبد الفيروسي نمط (B) (anti HBc IgM) في المصل باستخدام فحص الاليزا:

Detection of anti hepatitis B core antigen is (anti HBc IgM) in serum by Elisa test

تم الكشف عن الضدات النوعية (IgM) للمستضد اللبي لفيروس التهاب الكبد نمط (B) باستعمال العدة التشخيصية (Bioelisa anti HBc IgM-kit) (Chau et al., 1983).

1.4.3.3. مبدأ الفحص:

(Bioelisa anti HBc IgM) هو اختبار انزيمي مناعي مزدوج. تغطى حفر الطبق (microtiter Plate) من الداخل بضدات وحيدة النسيلة (monoclonal antibodies) للمستضد البشري (anti-human IgM). تحضن العينة المراد فحصها في حفر الطبق لمدة ساعة بدرجة (37) مئوية.

ففي حالة احتواء العينة على الضدات (IgM antibodies) ، سترتبط مع المستضد (anti- IgM) المثبتة على السطح الصلب للحفر، يغسل الطبق وتزال منه المواد غير المرتبطة، بعدها يضاف المستضد اللبي (HB_cAg) الى حفر الطبق ويحضن ثانية لمدة (3) ساعات بدرجة حرارة (37) مئوية بعد الحضانة الثانية والغسل ، يضاف المستضد اللبي (HB_cAg) المقترن مع انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) ويحضن للمرة الثالثة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة (37) مئوية. يغسل الطبق مرة اخرى بعدها يضاف محلول المادة الاساس الانزيمي (Enzyme Substrate Solution) الحاوي على المادة الملونة. اذا احتوت العينة على الضد(anti HB_c IgM) فان المادة ستتطور الى اللون الازرق. اللون الازرق يتغير الى اللون الاصفر. بعد ايقاف التفاعل باضافة (1N) من حامض الكبريتيك (H_2SO_4)، الشدة اللونية الناتجة تتناسب طردياً مع كمية الضدات(anti HBc IgM) في العينة .

2.4.3.3. طريقة العمل:

1. خففت العينات بمقدار (100/1) وذلك بنقل 10 مايكروليتر من المصل الى انبوبة الاختبار واضافة (1) مللتر من المحلول المعدل المخفف. ومزج جيداً.
2. نقل (200) مايكروليتر من المنظم الموجب الى 3 حفر و 200 مايكروليتر من المنظم السالب (Negative control) الى حفرتين، تركت حفرتان خالية لعمل البلانك (blank).
3. وزعت (10) مايكروليتر من كل العينات المخففة في الحفر المخصصة لها. بعدها اضيف 200 مايكروليتر من المحلول المعدل المخفف(Diluent buffer solution) لكل حفرة حاوية على العينة المخففة.

4. غطي الطبق بغطاء لاصق. ونقر بلطف لمزجه وحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة (37) مئوية.
5. ازيل الغطاء اللاصق. شفطت محتويات الحفر وملأت بصورة كاملة بمحلول الغسل المخفف (Diluent washing solution). واعيدت عملية الشفط – الغسل اربع مرات. بعد الغسل الاخير، نشف الطبق على نسيج ماص لازالة السائل المتبقي في الحفر.
6. اضيف 100 مايكروليتر من محلول (HBc Ag) لكل حفرة باستثناء البلانك .
7. غطي الطبق بالغطاء اللاصق وحضن لمدة (3) ساعات بدرجة حرارة (37) مئوية.
8. ازيل الغطاء اللاصق وغسل الطبق كما في الخطوة (5).
9. اضيف 100 مايكروليتر من المقترن لكل حفرة باستثناء البلانك .
10. غطي الطبق بالغطاء اللاصق ، هز الطبق وحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة (37) مئوية.
11. خلال (5–10) دقائق الاخيرة من الحضانة، حضر محلول المادة الاساس . المحلول الملون .
12. ازيل الغطاء وغسل الطبق كما في الخطوة (5).
13. اضيف 100 مايكروليتر من محلول المادة الاساس . محلول المادة الملونة (TMB) الى كل حفرة بالاضافة الى حفر البلانك.
14. حضن الطبق بدون غطاء بدرجة حرارة الغرفة (20–25) مئوية لمدة (30) دقيقة.
15. اوقف التفاعل باضافة 100 مايكروليتر من (1N) حامض الكبريتيك لانهاء التفاعل.
16. صفر جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي (450) نانوميتر مقابل حفرة البلانك وقيست الامتصاصية خلال (30) دقيقة.

حساب النتائج:

1. معدل المنظم السالب (Negative control mean (NCx)):

وذلك بجمع قيم الامتصاصية وتقسيمها على2

$$NCx = \frac{Absorbance}{2}$$

2. معدل المنظم الموجب (Positive control mean):

تم حساب معدل المنظم الموجب من خلال جمع القيم الامتصاصية الفردية الحاصلة من المنظم الموجب وقسمتها على (3).

PCx=

على ان تكون كل قيمة من القيم الفردية الناتجة مساوية او اعلى من (0.5) مضروبة في (NCx) ومساوية او اقل من 1.5 مضروبة في (PC_x) وان أي قيمة خارج هذا المدى تهمل.

3. حساب الفرق بين المنظم الموجب والمنظم السالب:

الفرق بين المنظم الموجب والمنظم السالب يجب ان يساوي او يكون اعلى من 0.6

$PCx - NCx > 0.6$

4. حساب (Cut-off value):

تم حساب قيمة (Cut-off) من خلال ضرب معدل الامتصاصية للمنظم الموجب (PCx) في (0.25) واضافة معدل المنظم السالب (NCx) الى الناتج:

$Cut\text{-}off = (0.25 \times PCx) + NCx$

العينات ذات القيمة الامتصاصية المساوية أو الاعلى من قيمة (Cut-off) تعد موجبة (Positive) لوجود الضد (anti-HBc IgM) .

العينات التي تكون امتصاصيتها اقل من (Cut-off) تعد سالبة للفحص.

3 . 4 . الاختبارات الإحصائية:

حولت النتائج المستحصلة من هذه الدراسة إلى بيانات حسابية ومن ثم تم تحليلها إحصائيا بواسطة الحاسوب باستخدام برامج المرحلة العاشرة (SPSS version 10 / Statistical Package for Social Science).

التوزيع التكراري للمتغيرات قد اجري اولا. وبما ان التهاب الكبد الفيروسي باعتباره مرضاً مرتبطاً بقيم متباعدة مما يجعل افتراض التوزيع الطبيعي غير صالح وعليه فان الوسيط الحسابي Median قد استخدم بدلا من الوسط الحسابي Mean . الفروق الإحصائية المعنوية في الوسيط الحسابي للمتغيرات بين اكثر من مجموعتين تم تحليلها باستخدام اختبار Kruskall- Wallis الإحصائي ، في حين استخدم الاختبار Mann-Whitney للمقارنة

بـين مجمـوعتين . أمـا الفـروق الإحصـائية للتـرابط الخطـي Linear correlation بـين متغيرات مجموعتين فقد تم تحليلها بطريقة Spearman's correlation coefficient.

أعتبرت الاختبارات الإحصـائية ذات مغزى إحصـائي (معنويـة) كلما كانت قيم **P**اقل من (0.05) (Glantz, 1987).