



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى - كلية العلوم

قسم علوم الحياة

الدراسة الصباحية



((التحري عن فيروس أبشتاين - بار))

بحث تخرج مقدم إلى

مجلس قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى

وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل:-

علي طالب عبدان

سمر نزار علي

هدية سلمان ستار

بإشراف

أ.م.د. زهراء جعفر جميل

2019 م

1440 هـ

((بسم الله الرحمن الرحيم))
((هَذَا خَلَقَ اللهُ فَأَرْوِي مَاذَا خَلَقَ
الَّذِينَ مِنْ دُونِهِ بَلِ الظَّالِمُونَ
فِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ))

صدق الله العظيم

سورة لقمان الآية 11



الإهداء

إلى من خلقنا فسوانا ... الرحمن الرحيم
إلى معلم الإنسانية ونبراس الهدى ... سيدنا محمد
إلى من نحت في صخر الحياة ليمدني درب العلم و المعرفة ,
ويذلل كلامه كل مصاعب الدنيا و همومها ... والدي الحبيب
إلى التي ترتاح رؤيتها لنفسي , وبسط الله الجنة تحت أقدامها ... والدتي الحبيبة
إلى من لهم الفضل بعد الله تعالى , ومن ساندانا و وجهانا
ولم يدخر جهداً في تعليمنا ... أساتذتي الأعزاء
إلى الذين كانوا لي خير سند و عون لنا ... أخواني و أخواتي
إلى من نتمنى أن تبقى صورها في عيوننا ... دولتي
إلى كل من أحبنا و تمنى لنا الخير ... الى زملائي و زميلاتي

نهدي إليكم ثمرة جهدنا المتواضع ...

(الباحثون)

المحتويات

الصفحات	الموضوع
	1.3 الفصل الأول : المقدمة
	1.2 الفصل الثاني : أستعراض المراجع
	1.3 الفصل الثالث : المواد و طرق العمل
	1.4 الفصل الرابع : النتائج والمناقشة
	1.5 المصادر

الخلاصة

فيروس ابشـتـاين بار هو احد فيروسات عائلة الحلا المجموعة الثالثة (كاما). وفيروسات هذه العائلة تعتبر من الفيروسات التي يتعرض لها الانسان منذ الطفولة وكذلك تتميز بفترة الكمون Latent (phase) وكذلك يعتبر هذا الفيروس من الفيروسات التي قد يكون لها دور في الاخلال بنظام الخلية المضيفة وبالتالي يؤثر على العمليات الايضية لها .

بدأت هذه الدراسة من شهر كانون الأول 2018 الى شهر اذار 2019 حيث جمعت 30 عينة دم الأطفال مرضى لديهم تضخم بالغدد اللمفاوية ضاهريا تتراوح أعمارهم من (1-10 سنة) في انابيب خالية من المادة المانعة للتخثر ثم فصل المصل وحفظه في المجمدة ثم تم التحري عن EBV EBNA-1 IgG في هذه العينات طريقة الممتز المناعي المرتبط بالانزيم . ELISA بينت النتائج ان 28 عينة موجبه (+) في هذا الاختبار دلالة على وجود 2 Antibody عينه سالبه (-) وان النتائج الموجبة لهذا الاختبار قسمت الى موجبة قوية حيث كانت (2) عينة ، و موجبة واطئه (26) عينة ، وان نسبة الإصابة عند الذكور اعلى من الاناث .

الفصل الأول

1-1 المقدمة:-

الفيروس واسع الانتشار ويصيب حوالي 95 ٪ من سكان العالم . سمي الفايروس باسم العالمين مايكل ابيشتاين وايفون بار الذين ساهما باكتشاف الفايروس عام 1964 داخل خلايا عينة مأخوذة من ورم سرطاني . وهو يسبب كثرة الوحيدات العدوائية infectious (mononucleosis) الحمى الغدية (glandular fever) ، ويتصف هذا المرض بارتفاع درجة الحرارة (حمى)، ألم بالحجرة، تضخم الطحال والعقد الليمفاوية، التهاب الكبد، والتعب الشديد والارهاق ، الصداع، قد تصبح اللوزتين منتفخة للغاية ، يصيب هذا المرض بالأساس المراهقين الشباب (15_25سنة) ينتقل المرض من انسان الى اخر عن طريق اللعاب او التقبيل لذلك يسمى "مرض التقبيل". ويمكن ان يساهم السعال والعطس في انتشار الفيروس. احيانا يصاب الاطفال بفيروس ابيشتاين_بار ولا تسبب هذه العدوى اعراض عادة ، ويكون من الصعب تمييزها عن الامراض الاخرى الخفيفة التي ممكن ان تحدث خلال مرحلة الطفولة ، وبمجرد الحصول على الفيروس يستغرق الامر من اربعة الى ستة اسابيع حتى تظهر الاعراض ، وعلى الرغم من ان الاعراض تتلاشى بعد الاصابة الا ان بعض المرضى يشكون من التعب يستمر لأسابيع بعد الاصابة ، كما ان الناس قد لا يدركون انهم يحملون فيروس ابيشتاين بار في اجسامهم لان الفيروس النشط قد لا يسبب اي اعراض كما انهم يعتقدون انهم مصابون بالبرد او الانفلونزا(Dickens et al.,2008) يسبب الفيروس اصابة كامنة ، حيث يصيب في البداية الخلايا الطلائية (epithelial cell) وينتقل بعدها الى خلايا B الليمفاوية ويبقى مدى الحياة (Young and Rickinson, 2004) . في الحالة الطبيعية تشكل خلايا الظهارية وخلايا B الليمفاوية الخلايا الهدف للإصابة الاولية بالفيروس ، ومع ذلك يمكن ان يصيب الفيروس مجموعة كبيرة من الخلايا غير الليمفاوية ، وعادة الاصابة التي تحدث في مرحلة

الطفولة تؤدي الى امراض طفيفة او قد لا تسبب امراض , اما الاصابة في مرحلة البلوغ فأنها تؤدي الى حدوث كثرة الوحيدات العدوائية (Santpere *et al.*, 2014). وقد يرتبط الفيروس بمختلف الامراض السرطانية مثل سرطان الغدد الليمفاوية وسرطان الخلايا الطلائية للأنف والبلعوم , وامراض سرطانية اخرى, من ضمن الامراض التي يسببها :

- Burkett's lymphoma
- Hodgkin's lymphoma
- nasopharyngeal carcinoma (CNC)
- gastric carcinoma T cell lymphoma

(Wensing and Farrell, 2000)

ينتقل الفيروس بشكل اساسي عن طريق المسار الفموي , ولكن وجود دراسات تشير الى انتقاله عن طريق الدم ونقل الاعضاء وبذلك يشكل خطر كبير وخاصة في حالة نقص المناعة للفرد , وان عدم وجود لقاح وقائي مرخص يزيد من خطر انتشاره في العالم (Adjei *et al.*, 2008)

الامراض التي يصاحبها فايروس ابشتاين بار : التصلب المتعدد، او كما يعرف باسم مرض التصلب العصبي المتعدد (Multiple sclerosis).التهاب المفاصل الروماتويدي.التهاب المفاصل الشبابي مرض التهاب الأمعاء ، والتي تشمل مرض كرون والتهاب القولون التقرحي ومرض الاضطرابات الهضمية. ومرض السكري من النوع الأول (Kapranos *et al.*, 2003)

هدف هذه الرسالة هي التحري عن فايروس الابطشتاين بار في المرضى الذين لديهم

تضخم في الغدد اللمفاوية بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA).

الفصل الثاني

استعراض مراجع :

classification 1-2 التصنيف

ds DNA: المجموعة

Herpes virales : الرتبة

Herpesviridea العائلة

Lymphocrypto Virus الجنس

Human herpes Virus8 or Epstein – Barr Virus

تتضمن عائلة الهيريس herpesviridia , ثلاث عوائل ثانوية او تحت عائلة :-

الفا : فيروس الحلا البسيط (HSV) Herpes simplex virus

- Varicella zoster virus (VZV) فيروس الجدري المائي

تمتاز تحت العائلة نوع الفا (Alphaherpesviinae) بأن دورة التضاعف Replicative

Cycle لها تكون سريعة تبلغ 12-18 ساعة. وعادة ماتسبب تدمير الخلية المضيفة Lysis

وتنشأ أصابة كامنة في العقد الحسية Sensory Ganglia ولها مدى واسع من المضائف

ومثال هذه المجموعة هو فيروس الحلا البسيط 1- Herpes simplex virus

Herpes simplex-2

وفيروس الحماق النطاقي (vzv) Varicella-zoster virus

(Kramer and Enquist.,2013).

بيتا : فيروس المضخم للخلايا البشري - HSV, HCMV, Human cytomegalovirus ()
5)

- فيروس الهريس البسيط 6- (6) Herpes simplex virus

- فيروس هريس البسيط 7- (7) herpes simplex virus

تمتاز تحت العائلة نوع بيتا (Betaherpesvirinae) ببطء دورو التضاعف فيها اذا يكون

على الاقل 24 ساعة حيث تسبب هذه الفيروسات كبير حجم الخلية المصابة Cytomegalia

في داخل الجسم الحي In vivo وحتى خارج الجسم الحي In vitro عند زراعتها في المزرعة

النسجية وتسبب فايروسات هذا المجموعة عادة أصابة كامنة في غدد الافراز Secretory

Gland والخلايا اللمفية cell وLymphoreticular والكلية kidney ومن الامثلة لهذه

المجموعة هو الفيروس المضخم للخلايا cytomegalovirus و (HHV6) Humma

Herpes virus 6&7

كما : (EBV-2 ,EBV-1) Epstein – Barr virus

فيروس الهريس البشري (HHV-8) Human herpes virus

(Roizman *etal* . ,1990)

(Gamma herpes virinae) فتتميز جميعها بتضاعفها في الخلايا المولدة للخلايا اللمفاوية

lymphoblastiod التي تتخص فيما بعد الى الخلايا اللمفاوية البائية B-Lymphocyte

والخلايا اللمفاوية التائية T-Lymphocyte وعادة ماتسبب هذه الفيروسات اصابة كامنة في

النسيج اللمفاوي لها مدى ضيق من المضائف مثال على هذه العائلة فيروسات Karposis

sarcoma herpes virus

Epstein–Barr virus. (Roth.,2012).

2-2 الابيشتاين – بار فيروس (EBV) Epstein– Barr virus :-

EBV هو فايروس ينتمي لعائلة herpesviridae, وتحت عائلة gamma herpesvirus)

(Roizman *et al.*, 1990).

هو فيروس له شريط DNA مزدوج طوله (184 kpb), الجينوم الذي يشفر اكثر من 85 جين

, يتكون الجينوم الفيروسي من سلسلة بمقدار (0.5kb) من التكرارات الطرفية المباشرة في

احدى نهايتها والتسلسلات الداخلية المتكررة التي تعمل على تقسيم الجينوم إلى تسلسلات

قصيرة وطويلة والتي تمتلك القدرة على التشفير. الابيشتاين بار فايروس كما هو الحال

فيروسات الهريس الأخرى، يحتوي على بروتين حلقى الشكل يغطي شريط ال DNA المزدوج

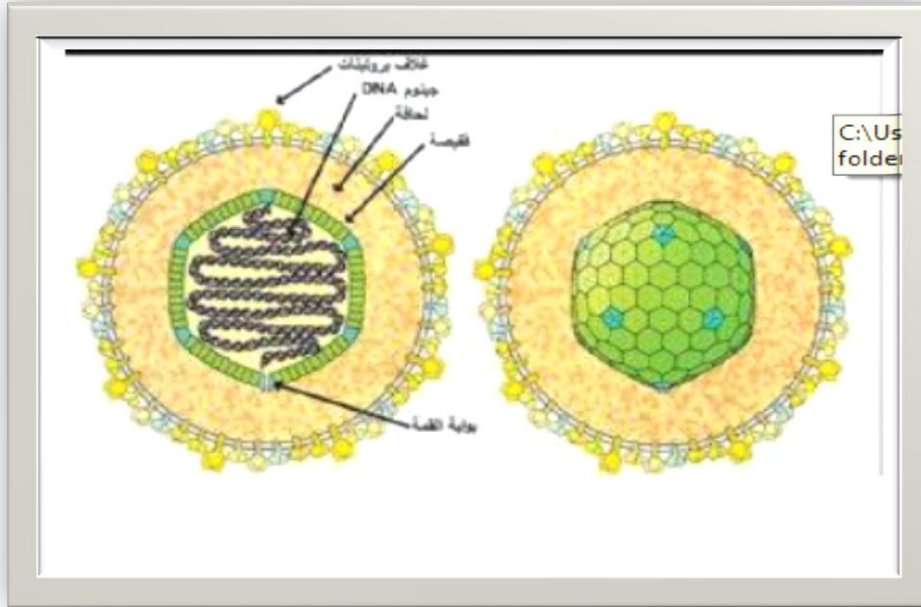
، nucleocapsid مع 162 capsomeres ، توجد حشوة بروتينية بين nucleocapsid ،

والغلاف الخارجي (envelope) ويحتوي بروتينات سكرية glycoprotein مع spikes كما في الشكل (1)، (2)، (Rickinson and Kieff, 2001).

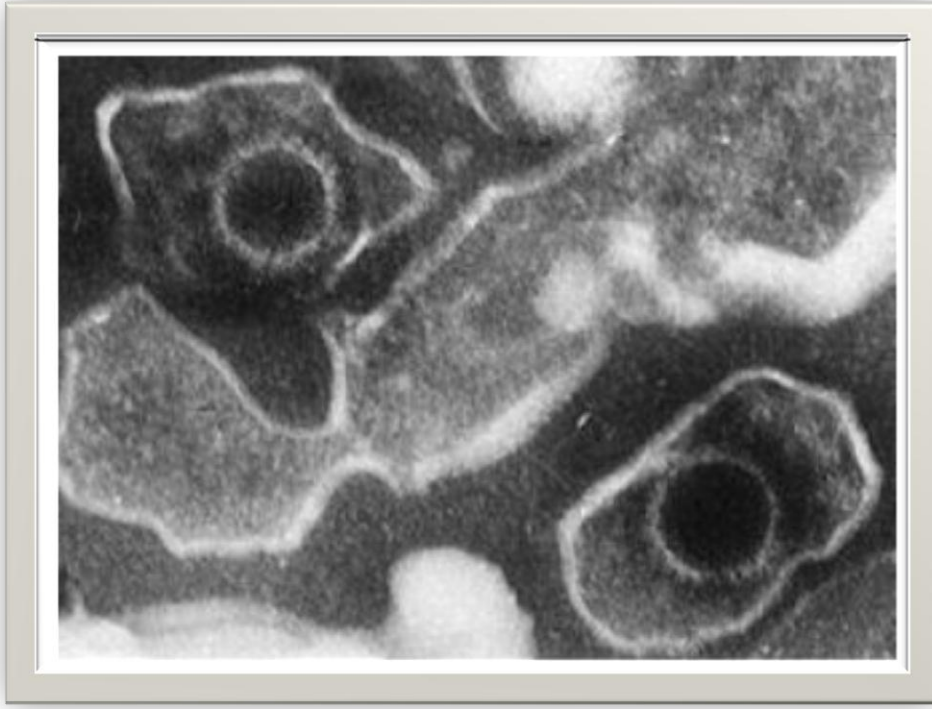
الحامض النووي للفيروس خيطي ، عندما يصيب الفيروس خلية المضيف ، يصبح الحمض النووي DNA عبارة عن حلقة دائرية ذات عدد مميز من تكرارات الطرفية ، وهذا يعتمد على عدد التكرارات الطرفية في الجينوم الأبوي ، مع إدخال التباين أثناء تكرار الفيروس. في حالة الإصابة الكامنة وليس الإصابة الفعالة او في مرحلة التضاعف (Baumforth *et al.*, 1999).

الايبشتاين بار فيروس (EBV) الذي يصيب البشر يكون بنوعين EBV-1 و EBV-2. يختلف EBV-1 و EBV-2 في تنظيم الجينات التي تشفر للمستضد النووي nuclear antigen (EBNA-2 و EBNA-3a و EBNA-3b و EBNA-3c) ، EBV-2 يجعل خلايا B أقل كفاءة من EBV-1 في المختبر ، وقابلية دفاع الخلايا الليمفاوية EBV-2 أقل من (EBV-1) (Buisson *et al.*, 1994).

قد تتعلق الاختلافات في كفاءة التحويل لأنماط الفرعية للـ EBV بالتباعد في تسلسلات EBNA-2، ويختلف EBV-1 و EBV-2 في التوزيعات الجغرافية، يلاحظ EBV-1 في كثير من الأحيان في معظم السكان ، ومع ذلك فإن EBV-2 أيضا منتشر تقريبا حيث يوجد في غينيا وأفريقيا الاستوائية ، وتبين ان نصف اورام سرطان الغدد الليمفاوية Burkett's lymphoma في افريقيا سببها EBV-2، وبالمقابل فان تقريبا 85% من سرطانات الانفية البلعومية (nasopharyngeal carcinoma) في تايوان تحتوي EBV-1 (Shu *et al.*, 1992).



شكل(1) جزيئة الفيرون الكامنة للفايروس الابشتاين بار(تخطيط)



شكل (2) جزيئة الفيرون الكاملة للفيروس الابطشتاين بار (ابشتاين بار)

(مجهر الكتروني)

3-2 أعراض الإصابة بفيروس إبشتاين بار :-

تحدث الإصابة بفيروس إبشتاين . بار في جميع أنحاء العالم ، وتصاب معظم الناس بفيروس إبشتاين . بار في مرحلة ما من مراحل حياتهم. يصاب الأطفال بفيروس إبشتاين . بار أحيانا. ولا تسبب هذه العدوى أعراض عادة، أو يكون من المستحيل تمييزها عن الأمراض الأخرى الخفيفة قصيرة الأمد التي تحدث في مرحلة الطفولة. عندما يصاب المراهقون بالعدوى بهذا الفيروس، فإنهم يكونون معرضين بنسبة خمسة وثلاثين إلى خمسين بالمائة للإصابة بداء كثرة الوحيدات المعدية (infectious mononucleosis). تؤدي الإصابة بداء كثرة الوحيدات المعدية إلى ظهور أعراض مثل: الحمى. التهاب الحلق. تورم الغدد اللمفية.

وقد يصبح الكبد والطحال متورمين أو متضخمين في بعض الأحيان أيضا. كذلك تسبب مشاكل في القلب والجهاز العصبي المركزي. ولكن هذه المشاكل لا تكون قاتلة . كذلك تسبب مشاكل في الحمل كالأجهاض أو حدوث تشوهات خلقية. يحدث عدد قليل جدا من الأشخاص الذين يحملون فيروس ايبشتاين بار نوعان من السرطانات (Barkett's lymphoma) والسرطانات الانفية البلعومية (santpere et al., 2014)

قد تكون الاعراض في الاطفال أشبه بأعراض البرد والانفلونزه :

- 1- الاعياء .
- 2- الحمى .
- 3- قلة الشهية .
- 4- الطفح .
- 5- التهاب الحلق .
- 6- تورم الغدد في الرقبة .
- 7- ضعف وألم العضلات .

* حيث يبدأ التحسس خلال 3 الى 4 اسابيع .

4-2 دورة حياة الفيروس داخل الجسم البشري:-

عادة ما ينتقل فيروس إيشتاين-بار عبر الاتصال المباشر وخاصة عبر اللعاب؛ مما أكبسه اسمه في الغرب بداء المراهقين (مرض التقبيل Kissing Disease). هذا وكثيرا ما يكون الفيروس موجودا داخل لعاب الأصحاء دون التسبب بالمرض. من جهة أخرى فإن انتقال المرض عبر الهواء أو الدم قليل الحدوث. يمكن انتقال الفيروس من الأم إلى الجنين عبر المشيمة . تمتد فترة حضانة المرض من 4 إلى 6 أسابيع يكون المصاب فيها معديا للأسابيع الثلاثة الأولى. ثم تظهر الأعراض بعد ذلك تباعا ويستمر ظهورها من شهر إلى شهرين. يصبح الفيروس بعد ذلك "كامن" في بعض الخلايا في الحلق والدم ويستمر بقاءه مدى الحياة. الفيروس هو نشط يستنسخ بدخل اللعاب ، الفيروس النائم في شكل غير نشط في الخلايا الليمفاوية B، والتي هي احد انواع خلايا الدم البيضاء ، ويقال إنه في الحالة "الكامنة" . الفيروس كامنا ويمكن تنشيطه بسبب المرض أو الإجهاد . يتم تمرير الفيروس من شخص إلى آخر داخل اللعاب . كما يمكن أن ينتقل اللعاب أثناء التقبيل أو من خلال تقاسم الطعام والشراب أو أدوات الطعام مع شخص مصاب . كما يمكن انتقال الفيروس من خلال لمس لعاب المصاب ثم لمس الفم أو الأنف أيضا . ويمكن السعال والعطس يساعد على انتشار الفيروس عن طريق اللعاب والمخاط . ويمكن أن يصل الفيروس أيضا عن طريق الدموع ، لكن من النادر انتشار فيروس إيشتاين بار من شخص إلى آخر عن طريق الدم . ويحدث انتشار للفيروس بين الاطفال الصغار في او دور الحضانة وخاصة في المناطق ذات المستوى الاقتصادي المنخفض (Kapranos et al., 2003).

كما تم الكشف عن الفيروس في افرازات عنق الرحم للمراهقات والنساء البالغات , وفي عينات السائل المنوي ولكن الادلة على انتشاره عن طريق الاعضاء التناسلية تكون محدودة وقد ينتقل الفيروس عن طريق حليب الام في ظروف نادرة (Enbom *et al.*, 2001).

وقد ينتقل الفيروس اثناء زرع الاعضاء, انتقال الفيروس مع عمليات زرع الاعضاء يشكل عامل خطر لحدوث مرض تكاثر الوحيدات العدوائية بعد الزرع (Scheenstra *et al.*, 2004).

2-5 سرطانات ذات علاقة بالفيروس

أرتبطت الإصابة بفيروس إبشتاين-بار بعدة أمراض سرطانية أشهرها سرطان بوركييت أو (الليمفوما الأفريقية) والسرطان الأنفي البلعومي. يعتقد أن إصابة فيروس إبشتاين-بار للخلايا للمفاوية يؤدي في مرحلة متقدمة إلى تعطيل بعض الجينات المسؤولة عن تنظيم دورة حياة الخلايا واكتشاف التحورات الجينية؛ الأمر الذي يؤدي لظهور أنواع من الخلايا للمفاوية الغير مضبوطة والتي يؤدي لتكون هذه السرطانات. يلاحظ أن تزامن حدوث الإصابة بفيروس إبشتاين-بار مع الإصابة بمرض الملاريا يعزز فرص حصول سرطان بوركييت نظرا لأن الإصابة بالملاريا تضعف رقابة الجسم على الخلايا المناعية مما يساعد فيروس إبشتاين بار على إحداث التحورات الجينية دون الكشف عنه (Strockeine *et al* 1998)

6-2 انتقال فيروس ابشتاين بار :-

- اللعاب .

*تم العثور على فيروس ابشتاين بار في اللعاب لذلك قد ينتقل الفيروس من :

• تقبيل شخص مصاب .

• الشرب من نفس زجاجة شخص مصاب .

• استخدام فرشاة اسنان الشخص المصاب .

• الدم .

ليس بالضرورة أن يكون مريض لكي يكون معدي لان فيروس ابشتاين بار يبقى في الجسم لفترة طويلة وقد يسيطر في هذه الفترة في الخلايا اي داخل الخلايا ويبقى فيها وله القدرة على ان ينشط مرة أخرى بعد اشهر او سنوات . ينشط فيروس ابشتاين بار فيروس بعد الإصابة الأولية فإنه احيانا يتم ظهور الأعراض . كما أن تناول الوجبات المغذية وتقوية جهاز المناعة . ينبغي لنا أن نتجنب العادات المعروفة لإضعاف الجهاز المناعي ، مثل تناول الكثير من السكر والدهون . نحن بحاجة لتناول بعض الدهون ، ولكن يجب أن تكون هذه الدهون الصحية ، مثل أوميغا 3 والدهون الغير المشبعة الأحادية . التدخين يقمع النظام المناعي لذلك يجب تجنبها (Rowe et al., 1990).

المحافظة على وزن صحي ، حيث أن زيادة الوزن قد تقلل من المناعة ضد الأمراض . كما أن ممارسة التمارين الرياضية بانتظام يعزز من نشاط الجهاز المناعي ويقلل من الإجهاد العاطفي . يمكن اتباع أنشطة مثل اليوغا والتاي تشي كما يمكن أيضا أن تساعد في الحد من

الضغط النفسي . لتقليل الاجهاد البدني ، وينبغي أن نحصل على كمية كافية من النوم ،
ومحاولة لتجنب الإصابة بالأمراض الأخرى . (Linde *et al.*,1996)

2-7 علاج فيروس ابشتاين بار :-

لا يمكن علاج ابشتاين بار بالمضادات الحيوية تذهب الاعراض من تلقاء نفسها دون علاج
في غضون بضعة أسابيع . ولكن يمكن القيام بالعلاج المنزلي لفيروس ابشتاين بار :

- 1- الحصول على الكثير من الراحة .
- 2- شرب الكثير من الماء والسوائل لتجنب الجفاف .
- 3- تناول سكاكر الحلق او الغرغرة بالماء الدافئ والملح .
- 4- تناول مسكنات الألم مثل الاسينا لعلاج الحمى وتخفيف الالام . (Young *et al.*, 2004)

2-8الوقاية من فيروس ابشتاين بار

- 1- لا يوجد لقاح يحمي ضد فيروس ابشتاين بار .
- 2- افضل طريقة لتجنب الإصابة هي عن طريق الابتعاد عن اي شخص مصاب .
- 3 - عدم مشاركة الممتلكات الشخصية بما في ذلك النظارات والاكسسوارات وفرشاة الأسنان
مع شخص مصاب .
- 4 - تجنب التقبيل . (Trottier *et al.*, 2012)

9-2 مضاعفات فيروس ابشتاين بار

معظم الناس المصابين بفيروس ابشتاين بار نادرا ما يعانون من مضاعفات او مشاكل ولكن في بعض الحالات يرتبط فيروس ابشتاين بار بتطور سرطانات وامراض خطيرة بما في ذلك :

- سرطانات الغدد اللمفاوية بوركيت غالبا في الفك .

- سرطانات هودجكن سرطان الغدد اللمفاويه

- امراض الدم النادره (Wensing *et al.*, 2000)

10.2 تشخيص فيروس ابشتاين بار

هناك طرائق عديدة لتشخيص الفيروس منها طريقة الممتز المناعي المرتبط لأنزيم ELISA . تستخدم تقنية إليزا كأداة تشخيصية في الطب وعلم أمراض النبات، وضابط جودة في صناعات مختلفة. المستضادات من العينات تكون مرتبطة بسطح بعدها يضاف جسم مضاد محدد على السطح اذا بإمكانها الارتباط بالمستضاد هذا الجسم المضاد يرتبط بالمنشط، و، في آخر خطوة، تضاف مادة تحتوي على المادة المتأثرة بالمنشط. التفاعل اللاحق ينتج إشارة قابلة للكشف الإشارة الأكثر شيوعا هي تغير في لون المادة أداء إليزا يتضمن وجود جسم مضاد واحد على الأقل، مع تحديد مستضاد معين. العينة المحتوية على كمية غير محددة من الجسم المضاد هي عبارة على كمية غير محددة من الجسم المضاد هي عباره عن محفزات

مثبتة على دعامة صلبة (عادة تكون صفيحة مكروية العيار من البوليبسترين) اما غير محدد (عبر امتصاصية السطح أو محددة) (عبر التقيد عن طريق جسد مضاد محدد آخر لنفس المستضد في ساندويش "إليزا). بعد أن أصبح المستضاد محفز مثبت، يضاف الجسم المضاد المكتشف، مكونة مركب مع المستضاد. من الممكن أن يكون اكتشاف الجسم المضاد مرتبط بشكل تساهمي مع المنشط، أو من الممكن أن يكون الجسم المضاد بحد ذاته مكتشف عن طريق جسم مضاد ثانوي، بحيث يكون مرتبط بمنشط من خلال اقتران بيولوجي. بين كل خطوة وأخرى، تكون الصفيحة مغسولة كلها بوساطة محلول منظف سلس، لإزالة أي بروتينات أو أجسام مضادة مرتبطة بشكل غير محدد. تتطور الصفيحة بعد خطوة الغسل. (Milpied *et al.*, 2000) من الملاحظ، أنه بإمكان إليزا إنتاج نماذج أخرى من معايير ارتباط اللجين بدلا من المعايير "المناعية" الصارمة، على الرغم من أن الاسم الأصلي لها كان مناعي" بسبب تداول استخدامه وسبب تاريخ تطور هذه الطريقة. الا أن هذا الأسلوب يتطلب بشكل أساسي توصيل كاشف يمكن تثبيته على الهيئة الصلبة بمحاذاة العامل الكاشف الذي سيرتبط بشكل محدد ويستخدم منشط لتوليد إشارة محددة بشكل جيد، يتم ذلك باستخدام منشطات التوليد إشارة محددة بشكل جيد. بين كل مرة يتم الغسل فيها، فقط الربيطة تحدد ارتباط المحددين ليقوا مرتبطين بشكل محدد بالشكل الصلب، عن طريق تفاعلات مستضد جسم مضاد "ممتزمناعي" (Mentzer *et al.*, 2001). إن نوع تفاعل المستضد-الجسم يستخدم لأنه من السهل إنشاء جسم مضاد بخاصة ضد مستضد في كتلة ككاشف . بالتعاقب اذا كان الحليل جسم مضاد يمكن استخدام المستضد الهدف كعامل ارتباطي. (Kyaw *et al.*, 1992).

انواع الاجسام المضادة (Ags) المستخدمة في التشخيص

• الاضداد المناعية الفيروسي للكاسيد (VCA- IgM)

• الاضداد المناعية الفيروسي للكاسيد (VCA IgG -)

• الاضداد المناعية (D) المبكر (D- EA)

• الاضداد المناعية لنواة فيروس ابشتاين بار (EBNA)

-: Pathogenesis 11-2

التسبب في العدوى يحدث الالتهاب الرئوي المزمن لأول مرة في البلعوم الفموي داخل

B تتفاعل الخلايا اللمفاوية النائية مع البكتريا المصابة أولا من الجسم المضاد IgM الى

الفيروسية عندما يكون الفيروسية هي التي تصيب المفاويات الباغدة السالبة السامة للخلايا

وينتشر بعد ذلك إلى Tlymp tos blosd . الاستجابة المناعية ضد العدوى EBV ngi de

القبعات الفيروسية بالاضافة الى الاجسام المضادة ل EBV Specific ، فإن مصطلح

heterophil يشير الى الاجسام المضادة التي تكون الاجسام المضادة غير النوعية هي التي

تسببها ، ويمكن اعادة تنشيط العدوى الكامنة ولكنها عادة ما تكون بدون اعراض حيث هو

عامل من عدوى اعادة التنشيط .

الدراسات السابقة

هناك دراسات سابقة عن فيروس ابشتاين بار في سنين مختلفة وعنوانين مختلفة كما هي موضحة

في الجدول (1)

جدول (1) الدراسات السابقة

العنوان	المكان	السنة	اسم الباحث	ت
Incidence of Epstein Barr virus infection in newly di-agnosed non-Hodgkin lymphoma in national center of hemotology single center study	الجامعة المستنصرية	2014	علاء فاضل علوان، زياد احمد واخرون	1
The Expression of Epstein -Barr virus in Breast cancer in relation to age	جامعة ديالى	2011	هدى عدنان الموسوي واخرون	2
Epstein-Barr virus In Iraqi patients with Nasopharangeal carcinoma	المجلس العراقي للأختصاصات الطبية	2006	Batool Mutar Mahdi	3
Antibodies to Epstein-Barr virus(Kissing disease) in Thalassemic patients	كلية اليرموك الجامعة	2011	عبير عبد القتي محمد واخرون	4
Role of Epstein - Bar virus (EBV) in human Females with breast cancer	جامعة بغداد	2017	Abbas Sabbar Dakhil	5
The Role of inter Leakin - 10 in infectious Mononucleosis Like Syhdrome	المجلس العراقي للأختصاصات الطبية	2006	. Jabbar , R , Z	6
The role of Interferon - gamma (If N _ y) in infectious mononucleosis like Syndrome	جامعة بغداد	2007	Jabar R . Z . AL _ Autabbi	7
Detection of Epstein Barr virus in Renal Trans plant Recipients Two Centers Study	جامعة النهريين	2015	Sahar A . Shams _ qldein	8
Epstein-Barr virus and P53 Gene expression crrelation with Gastric Adeno carcinoma patients in Baghdad City	جامعة بغداد	2016	Noor AL-Hud Ali	9
Immunohistochemical Expression of Epstein-Barr virus Antigen latent Membrance protein-1 and Bcl -2 inclassical Hodgkin lymphoma	المجلة العراقية للعلوم الطبية	2012	صبيح باسم المدلل ، غسق محسن عبيد	10

molecular localization of latent Epstein-Barr virus Early Repeats (EBERS) in cervical tissue with Adeno carcinoma by RNA-Insitu hybridization	الجامعة المستنصرية	2015	سعد حسن محمد علي	11
correlation of Epstein-Barr virus and CD3T infiltrating lymphocyte with oral Squamous Cell carcinoma patients	الجامعة المستنصرية	2017	نور الهدى علي واخرون	12
Sero prevalence of Epstein-Barr virus in children with acute lympho blastic leukemia	الجامعة المستنصرية	2014	خالد جمعة خليل	13
detection of Epstein-Barr virus Breast cancer using the polymerase chain Reaction and Insttu HyBridlzaation	جامعة بغداد	2010	سجى جهاد الخالدي	14
Sero prevalence and plasma viral Load of Epstein-Barr virus among Iraqi Blood Donors	جامعة النهرين	2017	إمجد قاسم رضا واخرون	15
molecular deterction Epstein-Barr virus in women with Breast cancer	جامعة بغداد	2013	أريج عطية حسين	16

الفصل الثالث

3- المواد وطرق العمل:-

1-3 الأجهزة والمواد المستخدمة:-

الأجهزة والمواد التي استخدمت في هذا البحث موضحة في الجدول (2)

جدول (2) الأجهزة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
1	جهاز الطرد المركزي Centerifugr	Hettich Zentrifugen , Germany
2	ثلاجه Refrigerator	BEKO RRN 2650 ,Turkey
3	حاضنة Incubator	Labtech Daihan , South Korea
4	جهاز Single distillation تقطير الماء	GFL Gesellschaft Labortechnik ,Germany
5	جهاز الاليزا	Germany

2-3 المحاليل المستخدمة كما في الجدول (3)

جدول (3) محاليل عدة الاليزا

<u>Symbol</u>	<u>Components</u>	<u>Volume /Cty</u>
<u>SORB MT</u>	<u>EBV VCA antigen coated microtiter</u>	<u>12</u>
<u>CLA A</u>	<u>Calibrator A (Negative Control)</u>	<u>2 ml</u>
<u>CLA B</u>	<u>Calibrator B (Cut-off Standard)</u>	<u>2 ml</u>
<u>CLA C</u>	<u>Calibrator C (Weak positive Control)</u>	<u>2 ml</u>
<u>CLA D</u>	<u>Calibrator D (Positive Control)</u>	<u>2 ml</u>
<u>ENZCONJ</u>	<u>Enzyme Conjugate</u>	<u>15 ml</u>
<u>SUBTMB</u>	<u>Substrate</u>	<u>15 ml</u>
<u>STOPSOLN</u>	<u>Stop Solution</u>	<u>15 ml</u>
<u>SAMDIL</u>	<u>Sample Dlluent</u>	<u>60 ml</u>
<u>WASHSOLN 10x</u>	<u>Washing Buffer (10x)</u>	<u>60 ml</u>

3-3 جمع العينات:

بدأت هذه الدراسة من شهر كانون الأول 2018 الى شهر اذار 2019 تم جمع 30 عينة من دم أطفال تتراوح أعمارهم (1-10) سنة لديهم اعراض في انتفاخ في الغدد اللمفاوية في مستشفى بعقوبة التعليمي وضعت في انايب خالية من المادة المانعة للتخثر ثم تركت الى ان يفصل طبقة المصل ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ثم نقل المصل الى انايب صغيرة معقمة وحفظت في المجمدة لحين الاستعمال .علما ان هذه الاختبارات أجريت في مستشفى بعقوبة التعليمي في المختبرات المركزية التعليمية قسم الفيروسات .

3-4 تشخيص الفايروس

تم استخدام طريقة المتمز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) للكشف عن EBV EBNA_IgG في المرضى الذين يعانون في تضخم الغدد اللمفاوية .

1.4.3 مبدأ الاختيار:-

اجري الاختبار المتمز المناعي المرتبط بالانزيم للكشف عن الضدات المناعية IgG لفيروس الالبشتاين بار .بعد إضافة المصل للحفر تمت عملية الحضان وبعدها عملية الغسل لإزالة جميع المكونات غير المرتبطة ثم إضافة محلول Chronogen حيث تحول الى اللون الأزرق ثم يتم إضافة محلول التوقف لوقت التفاعل اذا تحول اللون الى اللون الأصفر ثم يتم قراءة عند الطول الموجي 450 nm لقياس الامتصاصية .

2.4.3 اجراء الاختبار :-

1- تم تعليم حفر الصفيحة حيث كانت اول اربع حفر كالاتي :

حفرة ال Blank (للتصفير)

حفرة سيطرة سالبة

حفرة ال cut off

حفرة سيطرة موجبة واطئة Low positive

حفرة سيطرة موجبة قوية strong positive

ثم بعدها 30 حفرة للعينات ويتسلسل من 1-30

2- تمت اضافة 100 مايكروليتر للحفر الأربعة ماعدا (Blank) من المحلول المرفق بالعدة كل حفرة لها محلول خاص بها

3- تمت إضافة 100 مايكروليتر من كل عينة لكل حفرة من 1-30 مع مراعاة استخدام ال tip جديد لكل عينة

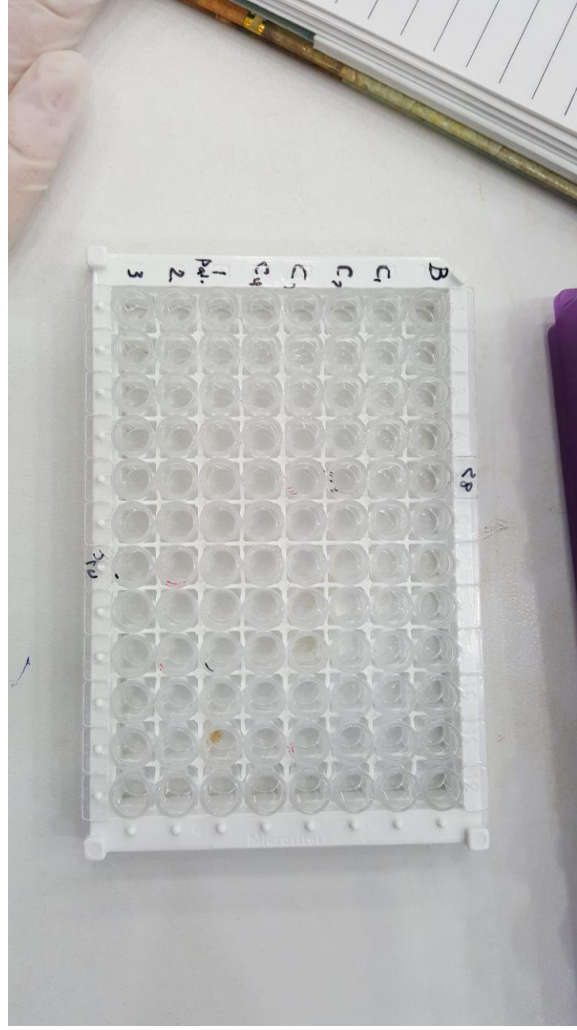
4- تم تغطية الصفيحة وتركت عند درجة حرارة الغرفة لمدة 60 دقيقة

5- تم تفريغ الحفر ثم إضافة 300 مايكروليتر محلول الغسل المخفف لكل حفرة (هذه الخطوة تكرر 3 مرات)

6- اضيف 100 مايكروليتر من محلول Conjugate لكل حفرة ماعدا ال (Blank)

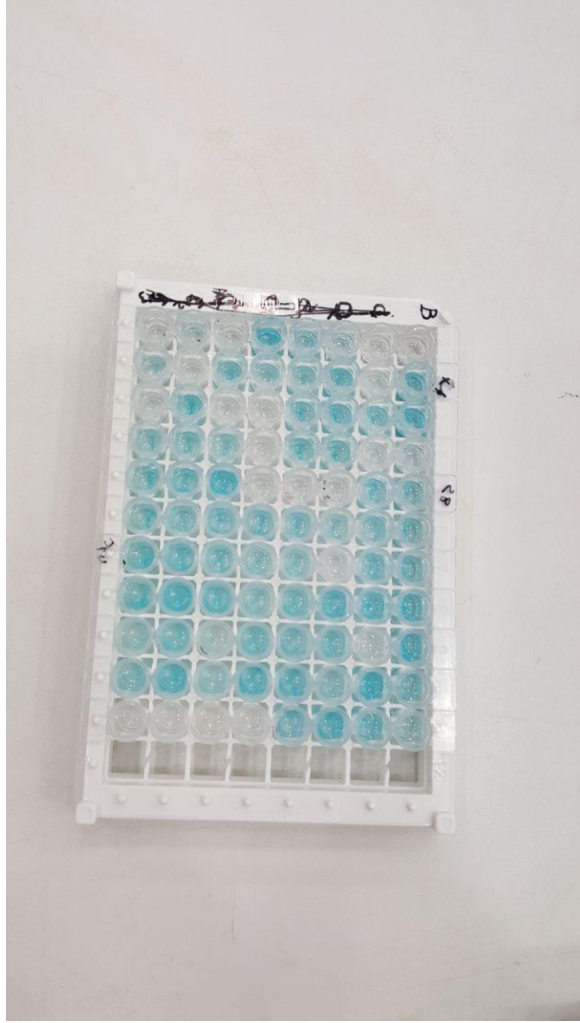
7- تم تفريغ الحفر ثم إضافة 300 مايكروليتر من محلول الغسل المخفف لكل حفرة (هذه الخطوة تكرر 3مرات)

8- أضيف 100 مايكروليتر من محلول Substrate لكل الحفر حيث يلاحظ لون المحلول في الحفر عديم اللون كما في شكل (3)



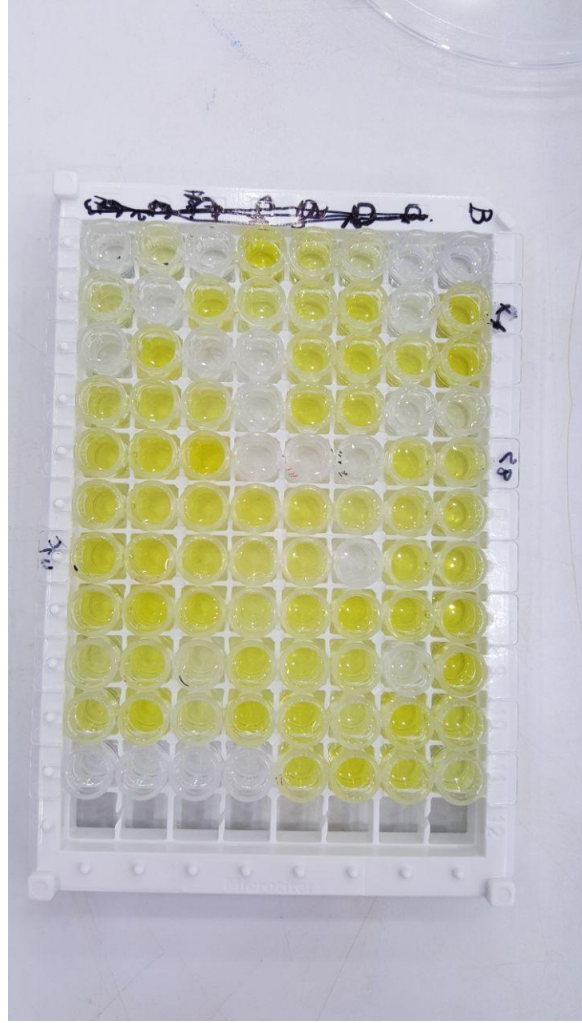
شكل (3)

9- تم تغطية الصفحة وتركت عند درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة في مكان مظلم (الدولاب مثلاً) بعدها يتم ملاحظة تحول لون المحلول في الحفر الى اللون الأزرق كما في الشكل (4)



شكل (4)

10- تم توقف التفاعل بأضافة 100 مايكروليتر من محلول التوقف Solution لكل Stop لكل الحفر حيث يتحول لون المحلول في الحفر الى اللون الأصفر كما في شكل (5)



شكل (5)

11- تمّت القراءة بالجهاز عند طول موجي 450nm

12- تمّت طباعة النتائج (كما في الملحق A)

الفصل الرابع

4-النتائج والمناقشة

التحري عن فيروس الابطشتاين بار هو استخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بأنزيم (ELISA) وفي هذه الدراسة تم التحري عن IgG EBNA-1 EBV في المرضى الذين يعانون من تضخم الغدد اللمفاوية حيث بينت نتائج هذه الدراسة ان (28) عينة موجبة و (2) عينة سالبة من مجموع (30) عينة و كما في الجدول (4)

جدول (4) نتائج EBV EBNA-1 IgG

المجموع	العينات السالبة	العينات الموجبة
30	2	28
% 100	% 7	% 93

اتفقت هذه الدراسة مع دراسة محلية سابقة وهي الباحث مهدي 2006 حيث كانت نسبة الإصابة %93.33 بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة الموسوي وجماعته 2011 كانت النسبة %40 وهذه الاختلافات قد تعود الى حجم العينة والفئة العمرية وزمن اخذ العينة والحالة المرضية .

كما ان النتائج الموجبة قسمت الى نتيجة موجبة واطئة ونتيجة موجبة قوية حيث كانت

2 عينة نتيجة موجبة قوية و 26 عينة نتيجة موجبة واطئة كما في جدول (5)

جدول(5) النتيجة الموجبة القوية والواطئة

المجموع	النتيجة الموجبة الواطئ (%)	النتيجة الموجبة القوية (%)
28	26	2
% 100	% 93	% 7

كما أظهرت النتائج ان نسبة الإصابة عند الاناث اعلى من الذكور حيث كانت عند

الاناث 19 وعند الذكور 9 كما في الجدول (6)

جدول (6) انتشار الإصابة حسب الجنس

الاناث %	الذكور %	المجموع %
19	9	28
% 68	%32	%100

لم تتفق هذه الدراسة مع دراسة علوان وجماعته حيث كانت نسبة الإصابة عند الذكور

(%70.4) اعلى مما في الاناث %29.6.

الفصل الخامس

المصادر:-

- Abdel-Hamid, M., Chen, J. J., Constantine, N., Massoud, M. and RaabTraub, N. (1992). EBV strain variation. geographical distribution and relation to disease state. *Virology*, 190:168–175.
- Adjei, A.A., Armah, H.B., Gbagbo, F., Boamah I. and Adu-Gyamfi, C. (2008). Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa, *BMC Infect Dis*, 8-111.
- Aitken, C., Sengupta, S. K., Aedes, C., Moss, D.J. and Sculley, T. B. (1994). Heterogeneity within the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 gene in different strains of Epstein-Barr virus *J. Gen. Virol.*, 75:95–100.
- AL-Khalidy, S.J., Abdul-Majeed, B.A., Mukhlis, F.A. and AL-Omar, L.M. (2010). DETECTION OF EPSTEIN BARR VIRUS IN BREAST CANCER USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION AND IN SITU HYBRIDIZATION Incidence. *Iraqi J. Biotech.*, 9(2): 248-857.
- Alwan. A.F.. AL-Rahal, N.K. and Shabeed, Z.A. (2014). Incidence of Epstein Barr Virus infection in newly diagnosed non Hodgkin lymphoma in the national center of hematology-single center study. *Iraqi Journal of cancer and medical Genetic*, 7(1): 21-25.
- Baumforth, K. R. N., Young, L. S., Flavell, K. J., Constandinou, C., and Murray P. G. (1999). The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol. Pathol*, 52: 307-322.
- Buisson, M., Morand, P., Genoulaz, O., Bourgeat, M. J., Micoud M., and Seigneurin, J. M. (1994). Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. *J. Gen. Virol.*, 75:431-437.

-Chan, K. H., Ng, M. H., Seto, W. H. and Peiris, J. S. (2001), Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J. Clin. Microbiol.*, 39(11):4152-415.

-Cheung, R., and Dosch, H. (1991). The tyrosine kinase Ick is critically involved in the growth transformation of human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 266: 8667–8670.

-Correa, R. M., Fellner, M. D., Alonio, L. V., Durand, K., Teyssie, A. R. and Picconi, M. A. (2004). Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and, 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J. Med. Virol.*, 73(4):583-588.

-Dickens, K.P., Nye, A.M., Gilchrist, V., Rickett, K. and Neher, J.O. (2008). Clinical inquiries. Should you use steroids to treat infectious mononucleosis *J Fam Pract.*, 57:754-5.

-Enbom, M., Strand, A., Falk, K. I. and Linde, A. (2001). Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm. Dis.* 28(5):300-306.

-Frank, D., Cesarman, E., Liu, Y. F., Michler, R. E. and Knowles, D. M. (1995). Posttransplantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. *Blood*, 85(5):1396– 1403.

-Goldschmidts, W. L., Bhatia, K. and Johnson, J. F. (1992). Epstein-Barr virus genotypes in AIDS-associated lymphomas are similar to those in endemic Burkitt's lymphomas. *Leukemia*, 6(9):875–878.

-Haddad, E., Paczesny, S., Leblond, V., Seigneurin, J. M., Stern «M. and Achkar, A. (2001). Treatment of B-lymphofroliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter Phase I-II clinical trial. *Blood*, 97: 1590–1597.

-Hayes, D. P., and Brink, A. A. T. P., Vervoot, M. B. H. J. «Middeldorp, J. M., Meijer, C. J. and van den Brule, A. J. (1999). Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Mol. Pathol*, 52 :97-103.

-Henderson, S., Hulen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus encoded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B-cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8479-8483.

-Hu, L. F., Zabarovsky, E. R. and Chen, F. (1991). Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma *J. Gen. Virol.*, 72: 399–2409.

-Kapranos, N., Petrakou, E., Anastasiadou, C. and Kotronias, D. (2003). Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic *Fertil Steril*, 79: 31566–1570.

-Kim, I., Park, E. R., Park, S. H., Lin, Z. and Kim, Y. S. (2002). Characteristics of Epstein-Barr virus isolated from the malignant lymphomas in Korea. *J. Med. Virol.*, 67(1):59–66.

-Klumb, C. E. and Hassan, R. (2004). Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int. J. Cancer.*, 108(1): 66–70.

-Klutts, J.S., Ford B.A., Perez N.R. and Gronowski, A.M. (2009). Evidencebased approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J Clin Microbiol.*, 47(10): 3204–3210.

-Kunimoto, M., Tamura, S., Tabata, T. and Yoshie, O. (1992). One-step typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: predominance of type 1 virus in Japan *J. Gen. Virol.*, 73: 455–461.

-Kyaw, M. T., Hurren L. and Evans L. (1992). Expression of B-type Epstein-Barr virus in HIV-infected patients and cardiac transplant recipients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8(11): 1869-1874.

-Linde, A. (1996). Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *Scand. J. Infect. Dis.*, 28 (Suppl. 100): 83–88.

-Mentzer, S., Perrine, S. and Faller, D. (2001). Epstein-Barr virus posttransplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: Pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate. *Transpl. Infect.*, 3: 177-185.

-Middleton, T., and Sugden, B. (1994). Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J. Virol.*, 68: 4067-4071.

-Milpied, N., Vasseur, B., Parquet, N., Garnier, J. and Antoine, C. (2000). Humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in post transplant Blymphoproliferative disorder: a retrospective. analysis on 32 patients. *Ann. Oncol.*, 11: 113-116.

-Moore, K. W., Rousset, F., and Banchereau, J. (1999). Evolving principles in immunopathology: interleukin-10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Springer Semin. Immunopathol*, 13: 157–166.

-Murray, P. G., and Young, L. S. (2002). The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front Biosci*, 7d: 519-540.

-Rickinson, A. B., and Kieff E. (2001). Epstein-Barr virus. In: B. N. Fields. D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds.) *Fields Virology*, Ed. 4, Vol. 2. pp. 2575–2629.

-Roizman, B. (1990). Herpesviridae: a brief introduction. In: B. N. Fields, and D. M. Knipe (eds.), *Virology*, Ed. 2, Version 2. New York: Raven Press, 1787-1794.

-Rowe, D. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci*, 4: 346–371.

-Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcami, A. and Villoslada, P. (2014). Mar Albà M. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol.*,6(4):846–860.

-Sbih-Lammali, F., Djennaoui, D., Belaoui, D., Bouguermouh, A. Decaussin, G., and Ooka, T. (1996). Transcriptional expression of Epstein-Barr virus genes and proto-oncogenes in north African nasopharyngeal carcinomas *J. Med. Virol.*, 49:7–14.

-Scheenstra, R., Verschuuren, E. A., de Haan A. (2004). The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients. *Transpl. Infect Dis*, 6(1): 15–22.

-Shu, C. H., Chang, Y. S., Liang, C. L., Liu, S. T., Lin, C. Z., and Chang, P. (1992). Distribution of type A and type B EBV in normal individuals and patients with head and neck carcinomas in Taiwan. *J. Virol. Methods.*, 38: 123–130.

-Strockbine, L. D., Cohen, J. I., Farrah, T., Lyman, S. D., Wagener, F. and DuBose, R. F. (1998). The Epstein-Barr virus BARTF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J. Virol.*, 72: 4015 - 4021.

-Trottier, H., Buteau, C., Robitaille, N., Duval, M., Tucci, M. and Lacroix, J. (2012). Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfus (Paris)*, 52(12): 2653–2663

-Wensing, B., and Farrell, P.J. (2000). Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microb. Infect*, 2:77-84.

-Yap, Y.Y., Hassan, S. and Chan, M. (2007). Epstein- barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Heat Neck Surg*, 136, 986-1.

-Young, L.S. and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10):757-768.



Ministry of Higher Education And
Scientific Research
Diyala University-College of Science
Biology Department
Morning Study



((Detection of Epstein Barr virus))

Graduation research submitted to

**Council of Biology Department/college of Science As a Partial
Fulfillment of the Requirements for the Degree of Bachelor in Biology**

Presented by

Ail Talib Abdan

Samer Nazar Ail

Hadya Salman satar

Supervised by

Asst. Prof. Dr. Zahraa Jaafar Jameel