التحديد والتوصيف الجزيئي في مختلف أنماط فيروس حمى الضنك الذي يصيب الإنسان في منطقة جازان، المملكة العربية السعودية

إعداد

عبد العزيز محمد حكمي

تحت اشراف

أ.د. اشتياق قادري

أ.د. خالد محمد سعيد الغامدي

المستخلص

فيروس حمى الضنك مرض فيروسي مستوطن ينتقل بواسطة البعوض، يحدث بانتظام في المناطق الاستوائيَّة من العالم. هذا المرض مستوطِن في العديد من الدول، بما فيها المملكة العربيَّة السعوديَّة. وقد تم الإبلاغ عن تفشي المرض في المملكة العربيَّة السعوديَّة خلال ١٩٩٤-٢٠١٦ مما نتج عنه تأثير كبير، سواء كان وبائيًّا واقتصاديًّا واجتماعيًّا. كما تمَّ الإبلاغ عن ثلاثة أنماط مصليَّة- على الأقل- لحمى الضنك، مما نتج عنها معدلات إمراضيه عالية ووفيات. لم يتم إجراء دراسة مكثفة للكشف الجزيئي، أو لتوصيف فيروس حمى الضنك في الإنسان في منطقة جازان، بالمملكة العربيَّة السعوديَّة. عادة ما تكون كل من IgM وIgG وNS1 هي العوامل الرئيسة للكشف عن الفيروسات، واعتبر تفاعل سلسلة البوليميريز المتسلسل (RT-PCR) والانماط المصليَّة محددًا وسريعًا، للكشف عن الحمض النووي الرايبوزي للفيروس في الإنسان المشتبَه فيه. وإن تطوير اختبارات تشخيصيه بسيطة، وبأسعار مناسبة، وحساسة للغاية ومحددة وقابلة للتطبيق؛ للكشف المبكر عن مسبب المرض، له تأثير كبير في إستراتيجيات التحكمات المستقبليَّة، وقد تم اختبارها في الدراسة الحاليَّة.

أجريت هذه الدراسة على ١٨٩ عينة دم، من مرضى الحمى الحادة (في مختلف الأعمار والأجناس وكذلك الجنسيات) خلال دخول المرضى للمستشفى لأول مرة، حيث شملت الدراسة ١٣ مستشفى بمنطقة جازان. تم فحص الأمصال المستخلصة من جميع عينات الدم التي تم جمعها لاختبارها بـ ELISA باستخدام ثلاث طرق مختلفة. وتم استخلاص الحمض النووي الريبوزي من ١٢٣ عينة دم موجبة، فُحصت باستخدام مجموعة حمض نووي عالي النقاء، خضع لتقنية RT-PCR باستخدام بادئات حمى الضنك. كما تمَّ استخراج الحمض النووي الريبيوزي للفيروس من ١٢ عينة دم إيجابيَّة الفحص ب RT-PCR وتنقيته، وتسلسلها، والبحث عن سلسلتها النيوكليوتيديَّة، وعن التشابه في البنك الجيني. وقد أظهرت النتائج لـ IgG نمطًا متزايدًا حسب العمر من الشباب إلى الفئات العمريَّة الكبيرة، وأظهرت نتيجة NS1 و IgMمن ناحية أخرى نمطًا مختلفًا، فارتفعت من الشباب إلى الكبار، وانخفضت لدى البالغين، ولم يتم اكتشافها في أعمار الشيخوخة. في الاختبارات المصليَّة المختلفة NS1، gM Iو IgG على التوالي، تم الكشف عن حالات إيجابيَّة عالية في الذكور ٢٥ (٢١,٤ ٪)، ٣٥ (٣٠,٥ ٪)، ٥٧ (٤٨,٣ ٪) مقارنة بالإناث ١ (١٥,٣٪)، ٢٠ (٢٨,٢ ٪)، ٢٢ (٣١,٠٪). وتم تسجيل نسبة عالية من حالات الإصابة بحمى الضنك في ٧ أشهر، ومنخفض في خمسة أشهر (اغسطس, سبتمبر, نوفمبر, ديسمبر ويناير). وقد ارتبط انتشار عدوى فيروس حمى الضنك الأساسي خلال أشهر مختلفة ارتباطًا كبيرًا بسقوط الأمطار. وكان الكشف عن DENV1 أكثر شيوعًا (٧٩,٧٪) يليه (١٦,٥٪) DENV2 والعدوى المختلطة المتزامنة مع كل من DENV1 و (3.8) DENV2 ولكنDENV3 و DENV4 لم يتم اكتشافهما في جميع عينات الدم المجمعة. تم كشف 79 RT-PCR (64.2) DENV عينات إيجابيَّة و٤٤ (٣٥,٨ ٪) سلبيَّة من مجموع ١٢٣ عينة. تم الكشف عن DENV1 و DENV2 بواسطة RT-PCR وكانت ٩٧٪ و٩٩٪ على التوالي مشابهة للتسلسل في Gen-Bank وتمَّ تعيين التشابه الخاص بتطورها. كان RT-PCR محددًا (٩٦,٨٪) والحساسيَّة (٩٥,١٪) مقارنة بNS1 . وقد خلصت الدراسة الحاليَّة إلى أن العمر هو عامل متغير

حاسم في العدوى الفيروسيَّة من النمط الثاني لحمى الضنك. وتم اكتشاف عدوى مختلطة متزامنة مع عدة أنماط مصليَّة من فيروس الضنكDENV1 وDENV2 حيث رصدت لأول مرة في منطقة جازان.

Molecular identification and characterization of different Dengue virus serotypes infecting human in Jazan Area Kingdom of Saudi Arabia

By

Abdulaziz Mohammed Hakami

Supervisors:

Prof. Mohammed Ishtiaq Qadri

Prof. Khalid Al-Ghamdi

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) infection is an endemic mosquito borne viral disease, regularly occurs in tropical regions of the world. DENV was endemic in many countries included Kingdom of Saudi Arabia (KSA). In KSA, the disease outbreaks have been reported in different time during 1994-2016 with significant impact which associated with epidemics, great economic and social impacts. At least three DENV serotypes have been reported in the KSA with high morbidity and high mortality rates. However, molecular detection and characterization of dengue virus among human in Jazan Area, KSA, have not been extensively studied. The development of simple, affordable, highly sensitive and specific and applicable diagnostic test is needed. RT-PCR based detection at field level, having significant impact on the future control strategies has been tested in the current study. The present study was conducted 189 blood samples collected from febrile patients of different age, sex and nationality during their admission into hospitals (13 hospitals at Jazan area). Sera from the all blood samples collected were subjected to ELISA assay, using three different commercial kits. RNA was extracted from blood samples using High Pure Viral Nucleic Acid Kit, subjected to one step RT- PCR molecular analysis using dengue consensus serotype-specific primers. Dengue virus RNA from RT-PCR positive samples was extracted, purified and their nucleotide sequences were aligned with NCBI data base. The linear results of IgG IELISA showed increasing pattern by age from young to elder age groups and the results of Nonstructural protein 1 (NS1) and Immunoglobulin M (IgM) on the other hand showed different pattern, which were increased from young to young adult, decreased to worth the adult and not detected by in the elder age group. In different serologic test NS1, IgM and IgG respectively, high positive cases were detected in male 25 (21.4%), 35 (30.5%), 57 (48.3%) compare to female 1 (15.3), 20 (28.2%), 22 (31.0%). High dengue incidence was detected in ٧ months and low in 5 months (August, September. November, December and January). The prevalence of the dengue primary course infection during different months was significantly correlated to the rain fall. DENV1 was more commonly detected (79.7%) followed by DENV2 (16.5%) and concurrent mixed infection with both DENV1 and DENV2 (3.8%) but DENV3 and DENV4 were not detected in all

collected blood samples. RT-PCR analysis has resulted 79 (64.2%) DENV positive samples and 44 (35.8%) negative out of 123 tested samples. DENV1 and DENV2 were detected by RT-PCR and were 97% and 99% respectively based on sequence similarity in Gen-Bank and their phylogenetic similarity, phylogenic trees were generated. RT-PCR was specific (96.8%) and the sensitive (95.1%) compared to NS1. We concluded, age is a crucial variable factor in secondary DENV infectivity and in case fatality. Concurrent mixed infection with multiple DENV serotypes (DENV1, DENV2) were detected for the first time in Jazan area.