



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

تحديد النمط الجيني والنمط المصلي لالتهاب الكبد الفيروسي (أ) بين المرضى في محافظة ديالى

رسالة مقدمة الى مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الحياة

من قبل
نور قاسم رشيد
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى
2020

بإشراف

الاستاذ المساعد
د. أنسام داود سلمان

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Department of Biology



Genotype and Serotype determination of Hepatitis A virus Among Patients in Diyala Province

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science, University
of Diyala, in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master in Biology

By

Noor Qasim Rashid

B.Sc. Biology /College of Science / Diyala University (2020)

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Ansam Dawod Salman

2023 A.D

1445 A.H

Chapter One

Introduction

1.1. Introduction

Hepatitis A is an inflammation of the liver caused by the hepatitis A virus (HAV). The virus is primarily spread when an uninfected (and unvaccinated) person ingests food or water that is contaminated with the faeces of an infected person. The disease is closely associated with unsafe water or food, inadequate sanitation, poor personal hygiene and oral-anal sex (Chatziprodromidou *et al.*, 2022). Epidemiologically, the distribution of HAV infection varies geographically, correlating with the sanitary and hygienic conditions plus socioeconomic status (Mukherjee *et al.*, 2022).

The clinical expression of the HAV infection is age-dependent, being asymptomatic in children (WHO, 2022). Children play an important part in the transmission of HAV. The seroprevalence of anti-HAV antibody by age group can be used as a marker for the epidemiological patterns of the HAV and viral transmission through the community (Wilson *et al.*, 2018). Seroepidemiological results have shown that transition to lower infection rates has occurred in several of the hyperendemic countries (Johnson *et al.*, 2019; Abdullah and Goreal, 2022).

The WHO categorized the endemicity of HAV as: high where the prevalence is greater than 50% in the population; intermediate where the prevalence is 15–50%; and low where the prevalence is less than 15% in the population (Chakravarti and Bharara, 2020; WHO, 2021). Areas of high endemicity include most of Africa, Asia, Central and South America. Contributing factors include household crowding, poor sanitation and inadequate water supplies. Iraq is considered as highly endemic area (Hasan, 2009; Abdullah and Goreal, 2022).

In communities with high endemicity, infection by HAV occurs among children less than 15 years, and most of the infection are asymptomatic. The disease severity during adults is more intense (Tan *et al.*, 2019).

In Iraq, the seroprevalence data are limited, Iraq is hyperendemic for hepatitis A (96.4%). inadequate hygiene, contaminated drinking water and tainted food are contributing to the spread of HAV (Merzah *et al.*, 2019). In Diyala province, the seroprevalence of HAV infection among apparently healthy people was 73.2% and it was significantly higher in those < 15 years (Hasan *et al.*, 2009). In a molecular study for detection of enteroviruses from sewage water in Diyala province, the detection rate of HAV is 58% reflecting the important role of unsafe water supply in the transmission of that virus (Hamad *et al.*, 2022).

Viral hepatitis caused by HAV infection is a worldwide disease; most cases are acute self-limited illness. The nucleotide sequence analysis of HAV has classified the virus in seven different genotypes, which include human (I-III and VII) and simian (IV-VI) groups. Most human strains belong to the genotype I, which has been divided into sub-genotypes IA and IB (Hussain *et al.*, 2005). Previous study occurred in India showed that the genotyping sequencing of 10 representative strains was carried out, and the circulating genotype was found to be IIIA. Additionally, the nucleotide sequences showed homology among the strains (Prakash *et al.*, 2020). The HAV variations of genome are according to the source and geographic region (Kozak *et al.*, 2022).

Serotyping is often used in epidemiological studies to identify the origin and spread of an outbreak and to develop vaccines and treatments (Chatziprodromidou *et al.*, 2022). Serotyping can be done using different techniques, including agglutination, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and polymerase chain

reaction (PCR) (Hofmeister *et al.*, 2019). The rate of spread of a specific serotype can depend on various factors such as-transmission routes (e.g., respiratory vs. fecal-oral), host susceptibility, and vaccination coverage (Hepatitis A. Geneva,2021).

Understanding the rate of spread of genotype and serotype is crucial for disease-surveillance, outbreak response, and vaccine development, among other public health measures (Johnson *et al.*, 2019).

1.2. Aims of the study

The present study was arranged in attempts to achieve the following goals:

1. Serological and molecular detection of Hepatitis A virus among patients in Diyala province.
2. Typing (Genotype and serotype determination) of Hepatitis A virus among patients by partial sequencing of viral genes.
3. Exploration of the effect of socio-demographic factors included age, gender, residence, level of education, source of food and water and vaccination with HAV vaccine on infection rate of HAV.

الخلاصة

التهاب الكبد A هو عدوى حادة تصيب الكبد، وغالبًا ما تكون بدون أعراض عند الأطفال وتزيد شدتها مع تقدم العمر. ويسببه فيروس التهاب الكبد نمط A (HAV) وهو أحد الفيروسات الكبدية الأولية، والتي تشمل أيضًا كل من التهاب الكبد الفيروسي نمط B (HBV)، التهاب الكبد الفيروسي نمط C (HCV)، التهاب الكبد الفيروسي نمط D (HDV)، التهاب الكبد الفيروسي نمط E (HEV)، التهاب الكبد الفيروسي نمط G (HGV)، الفيروس المصاحب لنقل الدم (TTV)، وفيروس الادينو 40 (Adenovirus 40). المادة الوراثية ل HAV عبارة عن RNA مفرد موجب إيجابي يبلغ طوله 7.5 كيلو بايت، ومصنف في جنس الفيروسات الكبدية من عائلة الفيروسات البكورية. ينتقل فيروس التهاب الكبد الوبائي عن طريق الفم عادة من خلال الأطعمة الملوثة ومياه الشرب. عادة ما تكون العدوى عند الأطفال بدون أعراض، لكنهم قادرين على نقل العدوى للآخرين. إصابة واحدة تؤدي إلى مناعة مدى الحياة. فترة الحضانة هي 2-6 أسابيع. تستمر الأعراض عادةً لمدة 8 أسابيع وقد تشمل الغثيان والقيء والإسهال واليرقان والحمى وآلام البطن. وقد تكررت الأعراض لدى حوالي 10-15% من الأشخاص خلال الأشهر الستة التالية للعدوى الأولية. على الصعيد العالمي، تحدث 1.4 مليون حالة إصابة بفيروس التهاب الكبد الوبائي سنويًا، وتحدث معظمها في البلدان الأقل نموًا حيث تسهل عوامل الخطر انتقال العدوى. يتطلب التشخيص فحص الدم، حيث أن الأعراض تشبه أعراض الفيروسات الأخرى. تتوفر لقاحات وقائية حية مضعفة ومقتولة لفيروس التهاب الكبد الوبائي.

أجريت الدراسة الحالية للفترة من 1 تشرين الثاني 2022 حتى 30 آب 2023 في محافظة ديالى. وقد تمت الموافقة عليها علميًا وأخلاقيًا. تهدف الدراسة الحالية إلى الكشف المصلي والجزيئي لفيروس التهاب الكبد الوبائي بين المرضى في محافظة ديالى، عن طريق التسلسل الجزيئي للجينات الفيروسية واستكشاف تأثير العوامل الاجتماعية والديموغرافية بما في ذلك العمر والجنس ومكان الإقامة ومستوى التعليم ومصدر الغذاء والحالة الصحية. الماء والتطعيم بلقاح فيروس التهاب الكبد الوبائي على معدل الإصابة بفيروس التهاب الكبد الوبائي. تم تضمين ما مجموعه 180 مريضًا. كانت الفئة العمرية من 1-7 سنوات. الأغلبية من الإناث (41.7% مقابل 20.8%). تم تضمين مجتمع الدراسة في مجموعة واحدة: 180 مريضًا. تم إعادة ترميز المعلومات الاجتماعية والديموغرافية المتعلقة بالعمر والجنس ومكان الإقامة ومصدر مياه الشرب والتطعيم ضد

التهاب الكبد الوبائي للمرضى. تم الكشف المصلي لفيروس التهاب الكبد الوبائي في عينات المصل بواسطة تقنية الاليزا لواصمات فيروس التهاب الكبد الوبائي IgM.

ظهرت النتائج أن نسبة إيجابية فيروس HAV IgM كانت 13.3%. كانت إيجابية HAV IgM أعلى بين المجموعة العمرية 1-2 سنة. بينما كانت أعلى بشكل غير ملحوظ بين الإناث مقارنة بالذكور (13) (54.2%). بالإضافة إلى ذلك، أظهرت النتائج أن معدل إيجابية HAV IgM بين أولئك الذين استخدموا مياه الاسالة (17) (70.8%) كان أعلى بكثير من مستخدمي ماء القناني (7) (29.2%). علاوة على ذلك، وجدت النتائج أن أولئك الذين لم يتم تطعيمهم بلقاح التهاب الكبد الوبائي كان لديهم معدل إيجابي أعلى بكثير (19) (79.2%) لفيروس التهاب الكبد الوبائي IgM.

تم إجراء الكشف الجزيئي على 24 عينة كانت إيجابية لـ IgM باستخدام RT-PCR التقليدي للكشف عن جين *vp1* وجين *UTR-5*. أظهرت النتائج أن معدلات الكشف عن الجين *vp1* كانت 6.1%، وعلى جانب الجين *UTR-5*، كانت 6.1% إيجابية للجين *UTR-5* 11 (45.8%) من المشاركين الذين كانت نتيجة إصابتهم بـ HAV IgM لديهم جين *UTR-5* قابل للاكتشاف. وفيما يتعلق بجين *VP1*، كشفت النتائج أن 45.8% من المشاركين الذين ثبتت إصابتهم بـ HAV IgM لديهم جين *VP1* قابل للاكتشاف. وكان الفرق ذو دلالة إحصائية.

اثنيتي عشرة عينة إيجابية للجينات المكتشفة *vp1* و *UTR-5* تم تقديمها للتسلسل لتحديد النمط الجيني لـ HAV. من بين 6 عينات من جين *vp1* أظهرت تسلسلات جيدة ولها رمز رمزي (NoorAnsam1)، NoorAnsam2، NoorAnsam3، NoorAnsam5، NoorAnsam4 و NoorAnsam6 تم تقديم تسلسلات جين *vp1* إلى بنك الجينات. تم نشر هذه السلالة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)، بينما تم تسجيل قاعدة بيانات السلالة في بنك بيانات الحمض النووي الياباني (DDBJ) وبنك الجينات لتسلسلات الحمض النووي مع رقم الانضمام لجين *vp1*. تم قبول كل هذه التسلسلات في بنك الجينات وكل تسلسل أخذ رقم الانضمام.

كشفت نتائج محاذاة الجين *vp1* عن وجود 11 اختلافًا في الحمض النووي مقارنةً بالتسلسلات المرجعية لتسلسلات HAV. تم تحليل الطفرات المرصودة بشكل أكبر لتحديد ما إذا كان هذا يؤدي إلى تغيير محتمل في مواقعها المقابلة في الأحماض الأمينية المشفرة من التسلسل الجيني *vp1*. تمت ترجمة جميع تسلسلات الأحماض النووية إلى تسلسلات الأحماض الأمينية المقابلة لها باستخدام مجموعة الترجمة Expasy. لقد وجد أن جميع المتغيرات الأحد عشر المكتشفة تسببت في أحد عشر تأثيرًا صامتًا في البروتين المشفر. بالنسبة للتنميط الجيني لـ HAV استنادًا إلى شجرة النشوء والتطور الشاملة للغاية التي تم إنشاؤها في هذه الدراسة، تم تحديد المشاركين الذين ينتمون إلى نمط وراثي واحد ضمن هوية HAV، وهو النمط الجيني IB الذي يمثل 6 مرضى.

أظهر الجين *UTR-5* تسلسلات جيدة، 6 منها كان لها رمز رمزي (NoorAnsam1)، NoorAnsam2، NoorAnsam3، NoorAnsam5، NoorAnsam4 و NoorAnsam6). تم تقديم تسلسل الجينات *UTR-5* إلى بنك الجينات، وتم نشر السلالة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)، بينما تم تسجيل قاعدة بيانات السلالة في بنك بيانات الحمض النووي الياباني (DDBJ) وبنك الجينات لـ تسلسل الحمض النووي مع رقم الانضمام لجين *UTR-5*. كشفت نتائج محاذاة عينات الجينات *UTR-5* عن طفرات صامتة فقط.