Screening of Antibodies to hepatitis B virus core Antigen (Anti Hbc total) in negative HBs - Ag blood units

Dr. Haissam Yazigi*
Dr. Yossef Zreik**
Iyad Sakr***

(Received 20 / 1 / 2020. Accepted 8 / 3 / 2020)

□ ABSTRACT □

A total of 90 negative anti-HBs blood samples were collected from Tishreen University Hospital Blood Bank in Latakia, Syria. Blood units were selected randomly regardless of age, gender and blood group. The samples were taken into anticoagulant tubes, the appropriate centrifugation was performed for each sample and blood plasma was obtained. The competitive enzymatic immunoassay method (ELISA) was used by the appropriate kit to detect the presence of total HBc antibodies, since antibodies to HBc antigen may be the only marker of recent virus infection (Window Period) and also with some chronic carriers or due to mutations in virus, without necessarily being positive for HBs antigen. The results showed nine positive samples for total HBc antibodies. which represent 10% of the all tested samples. This is of critical diagnostic and medical importance to detect these antibodies in blood donors along with the HBs antigen, in order to increase the level of safety and to reduce the risk of hepatitis B infection through blood transfusion, as Blood Transfusion Centers in Syria investigate only the HBS antigen in blood donors to exclude the transmission of HBV infection through blood transfusion.

Keywords: Hepatitis B Virus, HBc Ab, Blood units, ELISA, HBs Ag.

*** Professor, Dept of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia, Syria.**
****Assistant Professor, Dept of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia, Syria.**
***** Postgraduate Student, Dept of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia, Syria.**

استقصاء أضداد المستضد اللبي لفيروس التهاب الكبد B (Anti HBc) في وحدات الدم سلبية العامل الاسترالي

د. هيثم يازجي*
د. يوسف زريق**
إياد صقر***

(تاريخ الإيداع 20 / 1 / 2020. قُبِل للنشر في 8 / 3 / 2020)

□ ملخّص □

تم جمع 90 عينة من وحدات دم سلبية العامل الاسترالي Anti HBs negative والموجودة في بنك دم مستشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، سورية. تم اختيار وحدات الدم بطريقة عشوائية بغض النظر عن العمر و الجنس وزمرة الدم. سحبت العينات على أنابيب مانعة للتخثر ومن ثمّ أجري التثفيل المناسب لكل عينة والحصول على المصورة الدموية (Plasma). استخدمت طريقة المقايسة المناعية الأنزيمية التنافسية ELISA باستخدام الكيت المناسب لتحري وجود الأضداد الكلية للمستضد اللبي لفيروس التهاب الكبد Anti HBc Total، حيث أن أضداد المستضد اللبي قد تكون الدلالة الوحيدة على العدوى الحديثة بالفيروس (فترة النافذة) وكذلك لدى بعض الحملة المزمنين أو وجود طفرات في بنية الفيروس، وذلك من دون ترافق هذه الحالات بالضرورة مع إيجابية العامل الأسترالي. أظهرت النتائج إيجابية 9 عينات للأضداد الكلية للمستضد اللبي، أي بنسبة 10% من مجموع العينات المختبرة. إنّ ذلك يشكّل أهمية تشخيصية وطبية بالغة لتقصّي هذه الأضداد لدى متبرّعي الدم جنباً إلى جنب مع العامل الأسترالي، وذلك لزيادة مستوى الأمان والتقليل من خطر العدوى بفيروس التهاب الكبد عن طريق نقل الدم، حيث أن مراكز نقل الدم في سوريا تكتفي بالتحري عن العامل الأسترالي لدى المتبرعين بالدم لاستبعاد نقل العدوى بفيروس التهاب الكبد البائي HBV عبر نقل الدم.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب الكبد B، أضداد المستضد اللبي، وحدات الدم، ELISA، العامل الأسترالي.

* **استاذ، قسم الطالب المخبري، كلية الطب البشري، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**
** **مدرس، قسم الطب المخبري، كلية الطب البشري، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**
*** **طالب دراسات عليا، قسم الطب المخبري، كلية الطب البشري، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

مقدمة:

يمثل فيروس التهاب الكبد B (HBV) سبب رئيسي لاعتلال الكبد المزمن والإصابة بسرطان الخلية الكبدية HCC (Hepato Cellular Carcinoma)، ويسبب ما يسمّى بالتهاب الكبد المصلي، كما يعتبر هذا الفيروس من أهم مسببات الالتهاب الحاد والمزمن للكبد في الدول العربية. ينتمي فيروس التهاب الكبد B إلى عائلة hepadnavirus حيث اشتقت كلمة hepa من مصطلح hepatotropic ويعني "تضخم الكبد"، وكلمة dna من نوع الحمض النووي الذي يتكون منه الفيروس وهو DNA (Baron, 1996).

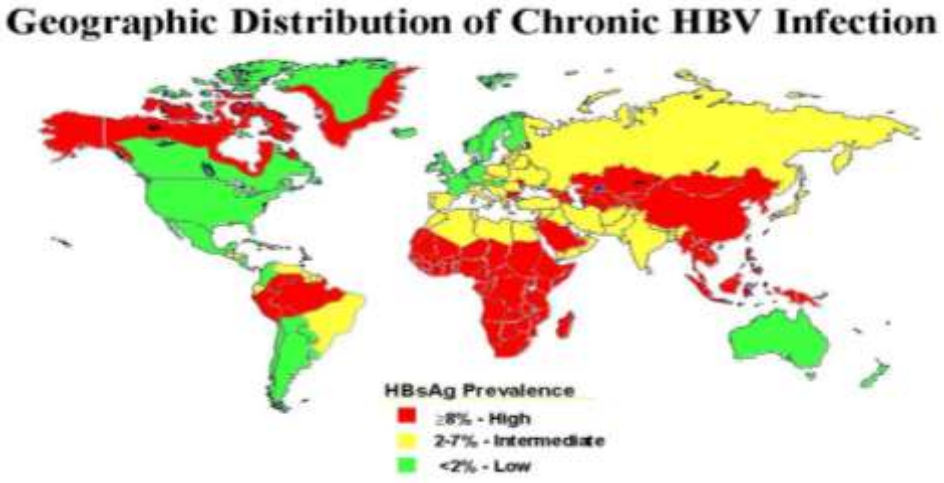
وصف التهاب الكبد بعد نقل الدم (HPT) منذ عام 1943، وذلك مع تطور طرق نقل الدم المختلفة، وفي عام 1965 تم اكتشاف المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد B أو ما يسمى بالعامل الاسترالي HBs Ag، حيث اكتشف العالم بلومبرغ Blumberg المستضد السطحي وأضداده في مصل أناس أستراليين. قام العالم باير Bayer في عام 1968 باكتشاف جزيئات متعددة الأشكال كروية وعصوية بواسطة المجهر الالكتروني في مصل المرضى المصابين بالتهاب الكبد B وفي عام 1970 اكتشف العالم Dane الجزيئات المسؤولة عن التهاب الكبد B والتي حملت اسمه حتى الآن. تمكن العالم Magnius ورفاقه عام 1972 من اكتشاف المستضد HBe والأضداد المتعلقة به، وتوصلوا إلى أنّ مصل المريض الذي يحوي هذا المستضد شديد العدوى (Gerlich, 2013).

أشارت العديد من الدراسات إلى خطورة التهاب الكبد B وعلاقته بالأمراض الكبدية المزمنة وسرطان الكبد حيث ثبت أهمية الأضداد HBc بكشف الحالات السلبية الكاذبة للعدوى والإصابة بالفيروس بتحريها في وحدات الدم ومنها دراسة أجريت في بندر عباس بإيران على مدة ستة شهور عام 2012، حيث تم فحص عينات دم لـ 1000 متبرع لتحري وجود واسمات الإصابة ب HBV. استخدمت طريقة الاليزا (ELIZA) للكشف عن HBc Ag وHBc Ab، حيث أظهرت الدراسة أن معدل إيجابية الـ HBc– Ab بين ال 1000 متبرع كان 3.8 % ، حوالي 3.2 % من المتبرعين كانوا إيجابيي أضداد المستضد اللبي anti–HBc فقط و سلبيين ل HBc Ag، هذه الدراسية بينت أن اكثر من 2 % من متبرعي الدم الأصحاء في بندر عباس قد تعرضوا لـ HBV رغم أن اختبارات الـ HBs–Ag لديهم كانت سلبية، اقترح إجراء مسح (تقصي) أساسي لـ anti HBc لتحسين أمان نقل الدم. (Khorami *et al.,* 2013). نظراً لأن الإصابات الكامنة بفيروس التهاب الكبد B أصبحت تشكل تهديداً عالمياً عظيماً ، فقد أجريت دراسة بهدف الكشف عن فيروس التهاب الكبد B الكامن في الأمصال سلبية المستضد السطحي باستخدام HBc – Ab كواسم لإصابة سابقة، تم اختيار أمصال 1000 متبرع بالدم سلبيي المستضد HBsAg بطريقة عشوائية و تحري وجود أضداد المستضد اللبي HBcAb و HBsAb باستخدام طريقتي الاليزا (ELISA) و الـ PCR. أظهرت النتائج وجود عينات إيجابية الـ HBs Ab مشيراً لمناعة كإصابة سابقة كما كشفت هذه الدراسة معدّل إصابة 5% بالتهاب الكبد الكامن بين متبرّعي الدم الماليزيين بالإضافة لموثوقية أضداد المستضد اللبي(HBc Ab) في مسح وتحري الإصابة بحالات التهاب الكبد B الكامنة، (Hudu *et al.*, 2016). على مدى عامين أجريت دراسة في لبنان حيث اختيرت عينات دم من 2500 متبرع لبناني عشوائياً وذلك بفترات زمنية مختلفة. تم فحص هذه العينات لتحري واسمات الإصابة بـ HBV (HBs Ag ،HBs Ab ،HBc Ab) أظهرت الدراسة إيجابية الـ HBs Ag عند 16% من المتبرعين. 56 (2.2 % من المتبرعين المفحوصين وجدوا إيجابيي أضداد المستضد اللبي لوحده فقط (anti –HBc alone) وهذا تقريباً أكثر بأربعة أضعاف من إيجابيّة HBsAg، تم إعادة فحص العينات بكيت اليزا (ELISA) آخر، وكانت 54 عينة إيجابية anti– HBc

alone، سبعة من العينات ال 54 كانت إيجابية الـ HBV DNA باستخدام PCR، نظرا لتلك النتائج اقترحت الدراسة إمكانية إضافة مسح anti – HBc كتحليل روتيني إلى جانب HBsAg لدي منزعي الدم اللبنانيين لتامين وقاية أكبر من انتقال الفيروس بنقل الدم. (Ramia et al., 2005). بين تموز وآب 2009 أجريت دراسة في نيجيريا، حيث أدخل 92 متبرع بالدم في هذه الدراسة. إن وجود HBsAg هو الطريقة الشائعة لكشف الإصابة بالتهاب الكبد، لسوء الحظ، قد لا يمكن كشف هذا الواسم خلال فترة النافذة من الإصابة، وباعتبار نيجيريا بلداً نامياً فلا يمكن تأمين اختيار DNA لكل وحدات الدم الذي يعتبر الوسيلة المثلى للوصول إلى شبه انعدام خطورة الإصابة ب HBV المرتبط بنقل الدم، باستخدام اليزا تم كشف HBsAg لدى 18 متبرع، وanti–HBs لدي 14 متبرّع من المتبرعين ال92، من الملاحظ أن (4.5%) من المتبرعين كان لديهم anti HBc gM كدليل مصلي وحيد على الإصابة بالتهاب الكبد B أشارت الدراسة إلى أهمية إدخال arti HBc IgM في المسح الروتيني لمتبرعي الدم في نيجيريا نظراً لأهمية ذلك في تحري الإصابة في فترة الناقدة.(Japhat *et al.*, 2011) أخضع 112 متبرع ثم في سان باولو إيجابيو anti–HBc معزول لتقييم سريري و إعادة فحص واسمات HBV. أولئك الذين أظهروا anti–HBc معزول فعلاً مرة بعد مرة، تلفوا جرعة أحدة من لقاح التهاب الكبد B للتحقق من استجابة anti–HBc الباكرة، أجري تقييم HBV–DNA بال PCR للذين أظهروا إيجابية لanti–HBs بعد اللقاح، بمقارنة نتائج الإيجابية الحقيقية والكاذبة لanti–HBc وحساب معدّلات SC المختلفة فقد خلصت الدراسة أن هذه الحسابات كانت مفيدة لتوضيح أهمية تحري HBcAb لمعظم متبرّعي الدم (Neto *et al.*,2001).

التوزع الجغرافي لمرض التهاب الكبد B ومعدل انتشاره:

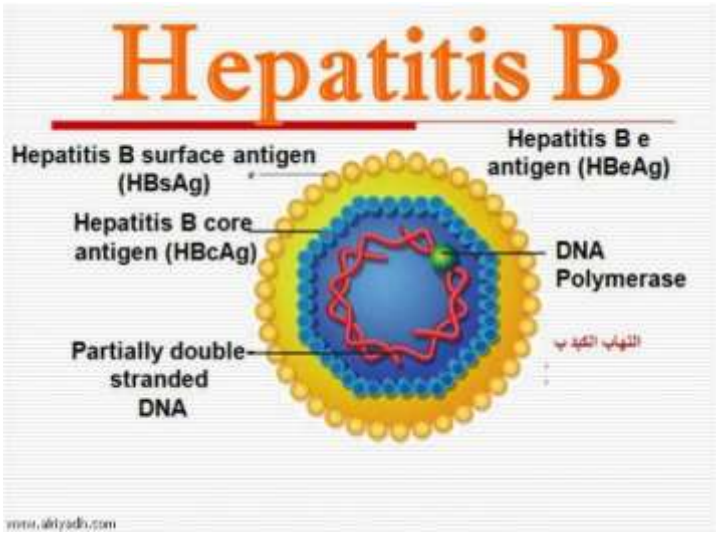
إن انتشار مرض التهاب الكبد B المزمن أعلى في مناطق شرق آسيا وافريقيا، في حين أن مناطق الانتشار المنخفض للالتهاب الكبدي الوبائي B تشمل أمريكا الشمالية وأوروبا الغربية (Buckley, 2017). يعتبر التهاب الكبد الفيروسيB سبب رئيسي للوفاة والعجز في جميع أنحاء العالم، ففي عام 2013 أودى بحياة حوالي 1.45 مليون شخص، وكان السبب الرئيسي السابع للوفاة في العالم وتحتل الصين المرتبة الأولى من حيث الوفيات الناجمة عن HBV حسب منظمة الصحة العالمية حيث يعود سبب الوفاة غالباً إلى حدوث قصور الكبد أو سرطان الخلية الكبدية HCC (Lixia *et al.*, 2018). تشير الإحصائيات إلى أنّ حوالي 2 مليار شخص في جميع أنحاء العالم قد أصيبوا بعدوى بفيروس التهاب الكبد B في الماضي أو الحاضر (أي خلال فترة من مراحل حياتهم)، إضافة إلى وجود حوالي 240 مليون شخص من الحملة المزمنين للمستضد السطحي للفيروس (WHO, 2015).



الشكل رقم (1): التوزع الجغرافي للإصابة بمرض التهاب الكبد B (Almahtab *et al.*, 2011)

بنية فيروس التهاب الكبد B:

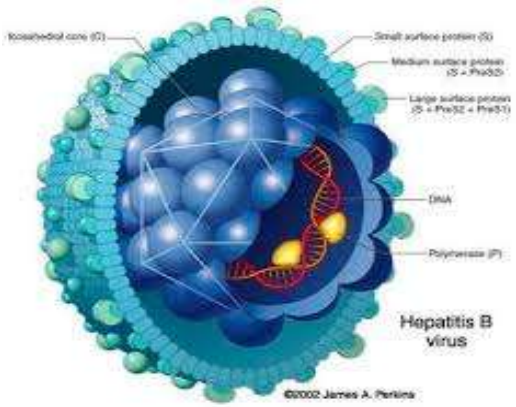
إن فيروس التهاب الكبد B هو فيروس مغلّف. يبلغ قطر الجزيء الفيروسي ما بين 47 – 42 نانومتر ويتكون جزيء الحمة المسمّى بالفيريون (virion) من قفيصة منوّاة عشرينية الوجوه تحيط بجينوم الحمض النووي الفيروسي المزدوج DNA والملتف جزئياً والذي يرتبط بشكل تساهمي مع البوليميراز الفيروسي (الأنزيم الناسخ العكوس) (Jianming *et al.*, 2017). يبلغ طول الDNA الفيروسي حوالي /3200/ نوكليوتيد وهو حلقي الشكل مزدوج السلسلة بشكل جزئي .تكون السلسلة الكبيرة كاملة، لكن يوجد فجوة من حوالي 1000 نوكليوتيد في السلسلة المقابلة المتممة، تغلق هذه الفجوة بفعل البوليميراز الفيروسية عند بدء التضاعف الفيروسي (Inan *et al.*, 2015) .



الشكل رقم (2): البنية الجزيئية لفيروس التهاب الكبد B (Ryan *et al.*, 2010)

يتكون الغلاف الخارجي من كمية قليلة من الشحوم ذات أصل خلوي وثلاثة جزيئات من البروتينات السطحية ذات طبيعة مستضدية: كبيرة (LHB) ومتوسطة (MHB) وصغيرة (SHB)، تعتبر هذه البروتينات جزء أساسي في دخول الفيروس إلى داخل الخلية الهدف (Pandeya *et al.*, 2011). يحتوي مصل الأفراد المصابين بعدوى HBV على 3جزيئات مختلفة من الفيروس:

جزيء صغير دائري وجزيء صغير خطي وهما بقطر /22 nm/: كلا الشكلين السابقين يعتبران جزيئات غير معدية، وتتركب فقط من كميات فائضة من غلاف الفيريون، النمط الثالث هو جزيء Dane بقطر /42 nm/ وهو معدي (IARC Working Group, 2012).



الشكل رقم (3): رسم تخطيطي للبنية الجزيئية لفيروس HBV (Sapirstein, 2018)

ينقسم HBV إلى أربعة أنماط مصلية رئيسية (adw, adr, ayw and ayr) وذلك استناداً إلى الحواتم المستضدية الموجودة على بروتينات الغلاف. كما ينقسم إلى تسعة أنماط وراثية (A–I) وفقاً للاختلاف في التسلسل الكلي لنكليوتيدات المادة الوراثية(Mojtaba *et al.*, 2016). يبقى الفيروس معدياً خارج الجسم حتى 7 أيام، وهو مقاوم للعديد من المطهرات والمعقمات، ولكنه يبقى حساساً لماء جافيل والغلوتار ألدهيد، كما أنه يقاوم التسخين لـ 60 درجة مئوية مدة 4 ساعات، والتجميد 20− درجة مئوية لعدة سنوات (Abdi *et al.*, 2015).

طرق العدوى بفيروس التهاب الكبد B:

يعتبر الإنسان المصدر الوحيد للعدوى بفيروس التهاب الكبد B حيث يشكل الأشخاص الحاملون للفيروس أو الذين يعانون من التهاب كبد حاد مصدراً قوياً للعدوى لمدة لا تقل عن مدة وجود المستضد السطحي في دمائهم. تنتج العدوى بفيروس التهاب الكبد B بشكل رئيسي عن طريق الدم (نقل الدم أو أحد مشتقاته) وسوائل الجسم المعدية التي تحتوي على الفيروس، إضافة الى الانتقال عن طريق الجنس، والانتقال من الأم إلى الجنين (ويحدث ذلك أثناء الولادة أو أثناء الحياة الجنينية داخل الرحم) حيث يعتبر الانتقال أثناء الولادة طريقاً رئيسياً للعدوى في البلدان المتوطنة وبشكل رئيسي البلدان النامية، وتمتلك الأم إيجابية المستضد السطحي HBsAg نسبة 20% لنقل العدوى أثناء الولادة، ويصل هذا الخطر إلى 90% إذا كانت الأم أيضاً إيجابية المستضد اليائي HBeAg. هناك طرق انتقال أخرى ثانوية أهمها: استعمال الإبر والحقن الملوثة عند مدمني المخدرات الوريدية – أدوات الحلاقة – فرشاة الأسنان –وخز الإبر لدى العاملين في المجال الطبي– مرضى التحال الدموي. (Greenwood *et al.*, 2007)

لا ينتقل فيروس التهاب الكبد B عن طريق الطعام والشراب أو المصافحة أو العطاس، كذلك لا ينتقل الفيروس عن طريق الرضاعة الطبيعية كما ذكرت بعض الدراسات أيضاً أن الرضاعة الطبيعية بعد الوقاية المناعية لا تؤدي إلى انتقال العدوى إلى الولدان. (Howard *et al.*,1986)

تم الكشف في بعض الحالات عن انتقال للفيروس ضمن أفراد العائلة الواحدة عن طريق القروح الجلدية أو الأغشية المخاطية، كما وجد DNA الفيروس في اللعاب والبول عند الحملة المزمنين (Locarnini *et al.*,2004)

الآلية الإمراضية والمناعية:

ليس لفيروس التهاب الكبد B أثر سمي مباشر على الخلية الكبدية. يثبت الفيروس على سطح الخلايا الكبدية بواسطة جزيئات الألبومين البوليميرية، ثم يدخل الخلية الكبدية ويتناسخ فيها ثم يتحرر إلى الدم. وجد أن التناسخ الفيروسي الشديد والذي يبته وجود DNA الفيروس في المصل في المرحلة الباكرة للمرض لا يصحبه خلل بالوظائف الكبدية. أثبتت المعطيات السريرية والنسيجية أن الإصابة الكبدية تحدث بتواسط آلية مناعية خلوية، وفقاً للآتي:

في التهاب الكبد الحاد: تلعب اللمفاويات التائية السامة دوراً هاماً ضد المستضد السطحي HBs Ag وتكون الخلية الكبدية هي المستهدفة حيث تنحل، ويعبر عن ذلك ارتفاع خمائر الترانس أميناز، كما أثبت أن كمية الغليكوبروتين ترتفع على سطح الخلية الكبدية المخموجة مؤهبة إعادة تعرّف اللمفاويات T عليها. تحدث المعقدات المناعية في حالة التهاب الكبد B الحاد (ضد + مستضد + متممة) بعض الأعراض الباكرة مثل الألم المفصلي.

في التهاب الكبد المزمن: تترافق حالة الحمل المزمن مع استمرار خمج الخلايا الكبدية مترافقاً مع استمرار تناسخ الفيروس B وبقاء المستضد السطحي HBs في الدم. ويمكن أن يعزى استمرار الخمج إلى نقص تعرف اللمفاويات على مستضدات HBV. يتواجد DNA الفيروس في المرحلة الأولية ضمن سيتوبلاسما الخلايا الكبدية المخموجة، ثم يندخل عدد قليل من DNA الفيروس المتناسخ ضمن DNA الخلايا الكبدية المخموجة.

إن معظم المصابين بإنتان مزمن لديهم معدلات أنزيمات كبدية طبيعية، وبدون أعراض سريرية وبمظهر نسيجي طبيعي أو قريب من الطبيعي. إنّ هؤلاء الحملة الأصحاء يبدون تحمّلاً مناعيّاً لهذا الفيروس ويكون الإنذار ممتازاً، لكن عند حدوث نقص في التحمل مع ظهور نسائل الخلايا T الفعالة، فإنّه يمكن أن يحدث التهاب كبد وأذية كبدية بتوسط الخلايا T (Dennis *et al*, 2004).

المستضدات و الأضداد الخاصة بفيروس التهاب الكبد البائي:

– مستضدات فيروس التهاب الكبد البائي:

HBs Ag: هو المستضد السطحي للفيروس يظهر أثناء فترة الحضانة، وقبل ارتفاع الخمائر الكبدية ALT، AST ليختفي تدريجياً في مرحلة النقاهة، وقد يستمر لأكثر من 6 أشهر في 10% من الحالات، وهنا يتحول التهاب الكبد الحاد إلى التهاب كبد مزمن. المستضد السطحي هو بروتين يتوضع على سطح كل من جسم الغلاف وعلى الجسيمات الكروية والخيطية الأنبوبية للفيروس، ويوجد أيضاً في مصل المرضى وسوائل البدن الأخرى. الطريقة الأكثر اتباعاً للكشف عنه هي الاليزا (ELISA). توجد محددة مشتركة لكل أنماط المستضد السطحي وهي المحددة (a) بالإضافة إلى أربعة محددات أو تحت أنماط هي: r, w, d, y وبالتالي يوجد أربعة أنماط رئيسية للمستضد السطحي، إن هذه المحددات النوعية هامة من الناحية الوبائية و لكن ليس لها علاقة بالفوعة.

HBe Ag: هو مستضد موجود بالجزيئات الفيروسية الكاملة، ووجوده يتفسر بتضاعف فيروسي عالي، واستمراره لفترة تزيد عن الشهرين يشير إلى أن التهاب الكبد سيدخل في مرحلة الإزمان، ويكشف أيضاً بطريقة الاليزا (ELISA). عند وجود طفرة تمنع تصنيع هذا المستضد أي HBe Ag سلبي و HBe Ab إيجابي يكون التضاعف الفيروسي إيجابياً أي أن الـ DNA الفيروسي إيجابي و يكشف عنه باستخدام الـ PCR.

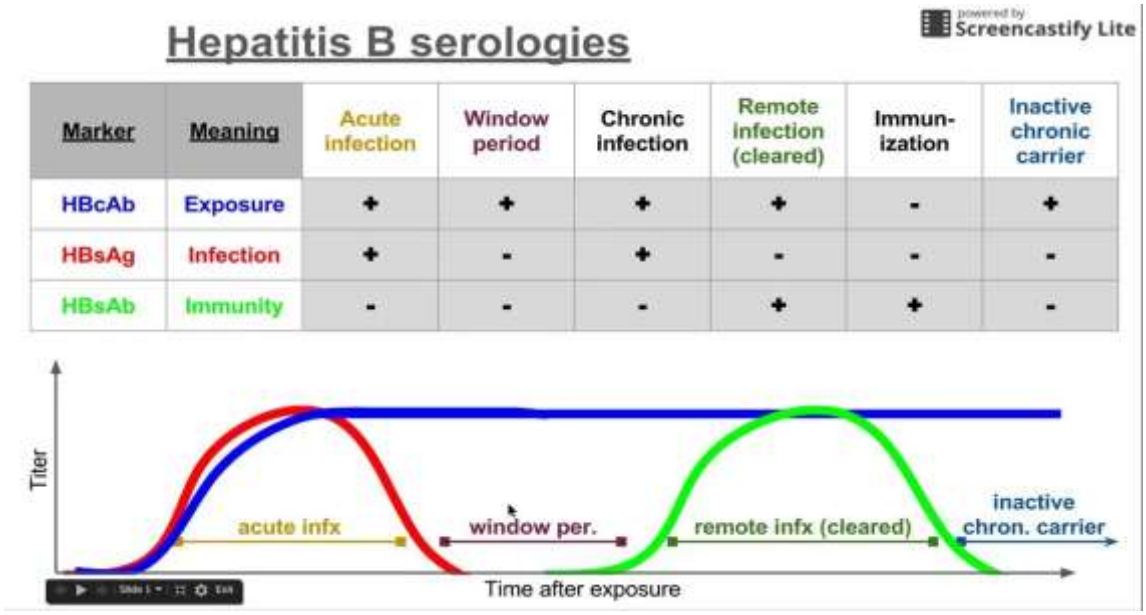
HBc Ag: هو بروتين شحمي نوعي للفيروس، لا يتواجد أبداً في المصل حيث يكون مغلفاً بالمستضد السطحي، يتواجد ضمن الخلية الكبدية و يؤدي إلى تصنيع أضداد.

– الأضداد تجاه فيروس التهاب الكبد البائي:

HBs Ab: يظهر بعد عدة أسابيع من اختفاء المستضد السطحي HBs Ag، وهو يشير إلى حدوث الشفاء من الإصابة بالفيروس أو إلى حدوث مناعة بعد اللقاح.

HBc Ab: قد يستمر هذا الضد مدى الحياة عند الحاملين المزمنين، ولعدة سنوات بعد الشفاء، وهو علامة هامة للوبائيات، فهو يكشف مصلياً بعد اختفاء HBs Ag وقبل ظهور HBs Ab.

HBe Ab: يساعد الكشف عن Anti–HBe في الطور الحاد للعدوى لتحديد حالة المريض، فاختفاء HBe–Ag المصلي وظهور Anti–Hbe يشير أنّ المريض يستجيب للعلاج، وأنّه سيشفى من HBs–Ag. (BONINO, F *et al.*, 2010)



الشكل رقم (4): الدلالات السريرية للواسمات المصلية (Greenwood *et al.*, 2007)

الجدول رقم (1): الاختبارات المصلية لالتهاب الكبد B (Gerlish, 2013)

الاختبار	الاختصار	الدلالة السريرية
المستضد السطحي لـ HBV (العامل الأسترالي)	HBsAg	يظهر أن الشخص مصاب بالتهاب الكبد B، و يكشف عادةً بعد فترة من العدوى الحادّة و خلال العدوى المزمنة.
أضداد المستضد السطحي لـ HBV	HBsAb	يظهر أنّ الشخص قد طوّر مناعة تجاه التهاب الكبد B، ويمكن اكتشافه في الأشخاص الّذين تعافوا من الإصابة أو خضعوا للقاح HBV
مستضد الغلاف الفيروسي	HBeAg	يوجد في المحفظة النووية للحمة و يمكن كشفه في مصل و مصورة المريض. يظهر في المصل قبل ظهور الأعراض و بعد ظهور HBsAg و يزداد عياره أثناء تكاثر الحمة و يستمر وجوده من 2 ← 8 أسابيع و يختفي قبل HBsAg. إن بقاء الإيجابية > 6 أشهر يشير إلى أن المريض مُعدي و لديه غالباً التهاب كبد مزمن فعال

الأضداد تجاه مستضد الغلاف الفيروسي	HBeAb	– يبدأ تشكله قبل اختفاء HBsAg و HBeAg ، و يصل إلى عيار مرتفع بعد 12 أسبوع – يشير وجود HBeAb إلى سير الآفة نحو الشفاء و عدم التحول نحو الإزمان. إن وجود HBeAb في مصل يحوي HBsAg يعني أن عيار الـHBV منخفض
المستضد اللبي	HBcAg	– يوجد في لب الحمة و يمكن كشفه في نوى خلايا الكبد بالفلورة المناعية – لا يوجد عادةً في مصل المصاب و إن وجد في المرحلة المبكرة من المرض فهذا يشير إلى وجود إصابة شديدة ، و استمرار وجوده خلال سير المرض يشير إلى التأذي الكبدي
أضداد المستضد اللبي	HBcAb	– يتواجد باكراً في المصل بعد ظهور HBsAg و HBeAg و يستمر وجوده بعد زوال HBsAg. في حال غياب HBsAg فإن الدليل الوحيد على وجود التهاب كبد B حاد و مُعدي هو وجود HBcAb ، و لذلك توصي بعض مراكز نقل الدم في العالم باشتراك HBsAg مع HBcAb لانتقاء المتبرع الصالح للتبرع

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من كونه يركز على إمكانية زيادة نسبة الكشف عن وجود الإصابة أو العدوى بفيروس التهاب الكبد البائي لدى متبرعي الدم، الذي يصيب مئات الملايين من البشر في العالم حسب منظمة الصحة العالمية (WHO) ويتسبب بحدوث وفيات كثيرة، وذلك عن طريق تحري الأضداد الكلية للمستضد اللبي للفيروس HBc Ab في وحدات الدم كعامل مساعد إلى جانب الاستقصاءات المستخدمة الأخرى وتحديداً العامل الاسترالي HBs Ag بهدف الكشف المبكر عن الفيروس إضافة إلى تقليل نسبة الحالات غير المكتشفة. وتعود مبررات البحث إلى أنه يساعد في:

1. الكشف عن الإصابات الحديثة بهذا الفيروس، حيث يكون وجود Anti HBc (IgM) في المصل بمثابة الدلالة الوحيدة على حدوث العدوى مؤخراً (فترة النافذة المصلية window period).
2. بعض الحملة المزمنين يكون العامل الأسترالي لديهم تحت المستويات القابلة للكشف بالاختبارات المصلية، أما Anti HBc (IgG) يستمر مدى الحياة لدى الحملة المزمنين ولعدة سنوات بعد الشفاء، ولذلك يعد علامة هامة للوبائيات.
3. التحري عن الإصابة بالفيروس في حالات عدم القدرة على كشف العامل الأسترالي نتيجة حدوث طفرات في الفيروس.

وباعتبار أن العامل الاسترالي يشكل المعيار المرجعي الوحيد المستخدم لتحديد وجود الفيروس في أكياس الدم بمركز تبرع بنك الدم باللاذقية، فإن استقصاء HBc Ab سيؤدي إلى مزيد من الأمان في نقل الدم وبناءً لما سبق فإن البحث

يهدف إلى: التحري عن وجود أضداد المستضد اللبي لالتهاب الكبد B الكلية (Anti HBc IgM + IgG) ضمن وحدات الدم سلبية المستضد السطحي (HBs Ag Negative) الموجودة في بنك دم مستشفى تشرين الجامعي.

طرائق البحث ومواده:

عينة البحث:

تم جمع عينات البحث من وحدات الدم الموجودة في بنك الدم في مخبر مشفى تشرين الجامعي سلبية العامل الأسترالي، وذلك خلال الربع الأول من العام 2019.

عدد العينات المدروسة 90 عينة من 90 وحدة دم مختلفة.

تم سحب حوالي 3–5مل من كل وحدة دم ضمن أنبوب EDTA ثم ثفلت الأنابيب مباشرةً بمقدار 3500دورة/دقيقة (لمدة 5 دقائق) وتم عزل المصل الناتج في عبوات حافظة باستخدام الميكروبيبيت، مع حفظ العينات بدرجة حرارة منخفضة (20–) درجة مئوية لحين وقت إجراء المقايسات، كل ذلك مع مراعاة جميع الشروط اللازمة لإجراء التحليل.

– وحدات الدم تم اختيارها عشوائيّاً

طريقة العمل:

استخدمت طريقة المقايسة المناعية الأنزيمية التنافسية ELISA، ومواد العمل كانت لشركة DIA Source (بلجيكا). المبدأ هو استعمال أضداد موسومة بالأنزيمات بحيث أنه عندما يتفاعل هذا الأنزيم مع الركيزة الخاصة به يتغير اللون بحيث إن مقدار تغير اللون يتناسب مع تركيز المادة المختبرة في العينة (جملة الأنزيم تستخدم لإيضاح التفاعل بين الضد والمستضد، حيث الأنزيم يكون مرتبط بضد أو مستضد نوعي). تضاف الركيزة إلى الاختبار بعد حدوث تفاعل الضد–مستضد، حيث هذه الركيزة تحل بالأنزيم المرتبط بمعقد ضد–مستضد، وتؤدي لتغير اللون. إن الأضداد والمستضدات المرتبطة داخل الحجرات أو في أنابيب الاختبار أو على سطح كرات السيللوز تدعى بالطور الصلب إن وجود هذا الطور الصلب يمنع المعقدات المتشكلة بعد إضافة عينة المريض من أن تزول بالغسيل.

محتويات كيت العمل:

	المحتويات	الوصف	الكمية
1	HBcAg Plate	عبارة عن لوحة تحوي 96 حجرة مغلفة بالمستضدات HBcAg	(1)
2	Anti–HBc Peroxidase solution	أنزيم مرتبط بالأضداد النوعية Anti–HBc (محفوظ في وقاء مع مثبتات بروتينية)	عبوة عدد (1) سعة 8 مل
3	Anti-HBc Positive Control	الشاهد الإيجابي: مصل الإيجابي لأضداد المستضد اللبي في وقاء مع مثبتات بروتينية. المواد الحافظة : % 0.003	عبوة عدد (1) سعة 1.5 مل

		جنتامايسين + 0.01 % ثيميروسال	
4	HB Negative Control	الشاهد السلبي: مصل سلبي تجاه واسمات HBV.	عبوة عدد (1) سعة 2 مل
5	Chromogenic TMB concentrate	الركازة الخاصة بالأنزيم	عبوة عدد (1) سعة 12 مل
6	Substrate buffer		عبوة عدد (1) سعة 12 مل
7	Conc. Washing Solution (x20)	محلول الغسيل المركز (يتم تمديده بالماء المقطر)	عبوة عدد (1) سعة 53 مل
8	Stop solution	محلول إيقاف التفاعل اللوني الحاصل	عبوة عدد (1) سعة 12 مل

مراحل الاختبار:

1. يتم إحضار جميع الكواشف والعينات ، و تكيف قبل استعمالها بحيث تصبح مساوية لدرجة الحرارة المحيطة.
2. تُترك الحجرة الأولى من Plate العمل فارغة من أجل البلانك.
3. نضيف 50 ميكرولتر من كل من الكونترولات والعينات إلى الحجرات المناسبة (3 حجرات للكونترول السلبي، و2 حجرة للكونترول الإيجابي).
4. يتم حضن الحجيرات (Plate) لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.
5. نقوم بإجراء عملية الغسيل لعدة مرات باستخدام محلول الغسيل الممدد ، و ذلك عن طريق جهاز الغسيل الخاص بالـ ELISA.
6. نضيف 50 ميكرولتر من Chromogenic TMB concentrate إلى جميع الحجيرات بما فيها البلانك.
7. نضيف 50 ميكرولتر من Substrate Buffer إلى جميع الحجيرات بما فيها البلانك، و نقوم بتحريك الـ Plate بلطف من أجل عملية المزج.
8. نقوم بتغطية الـPlate، و تحضن لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
9. نضيف 100 ميكرولتر من محلول إيقاف التفاعل إلى كل حجرة من الحجيرات.
10. نقوم بقراءة الامتصاصية لكل من الكونترولات و العينات بطول موجة 450 نانومتر، وذلك خلال مدة لا تتجاوز ال 30 دقيقة بعد إضافة محلول إيقاف التفاعل، وذلك باستخدام جهاز الـ Photometer الخاص بـ ELISA.

الشكل رقم (5): جهاز غسيل الـPlate المستخدم في العمل

الشكل رقم (6): ELISA Plate Analyzer (جهاز قراءة الامتصاصية الخاص بالـ ELISA)

<u>حساب النتائج :</u>

1- حساب NCx (القيمة الامتصاصية الوسطى للكونترول السلبي) :

NC 1	1.217
NC 2	1.131
NC 3	1.062

$$NCx = \frac{NC\,1 + NC\,2 + NC\,3}{3} = \frac{1.217 + 1.131 + 1.062}{3} = 1.137$$

يجب أن تكون $NCx > 0.4$،

2- حساب PCx (القيمة الامتصاصية الوسطى للكونترول الإيجابي):

PC 1	0.001
PC 2	0.005

$PCx = 0.003$

3 – حساب قيمة N – P (N – P Value) : $N - P = 1.137 - 0.003 = 1.134$

4 – حساب القيمة الحدية (Cutoff Value) : وفق الصيغة التالية

$$\text{Cutoff Absorbance} = 0.4 \times NCx + 0.6 \times PCx$$
$$= 0.4 \times 1.137 + 0.6 \times 0.003 = 0.456$$

العينات > 0.456 إيجابية HBc Ab العينات < 0.456 سلبية HBc Ab

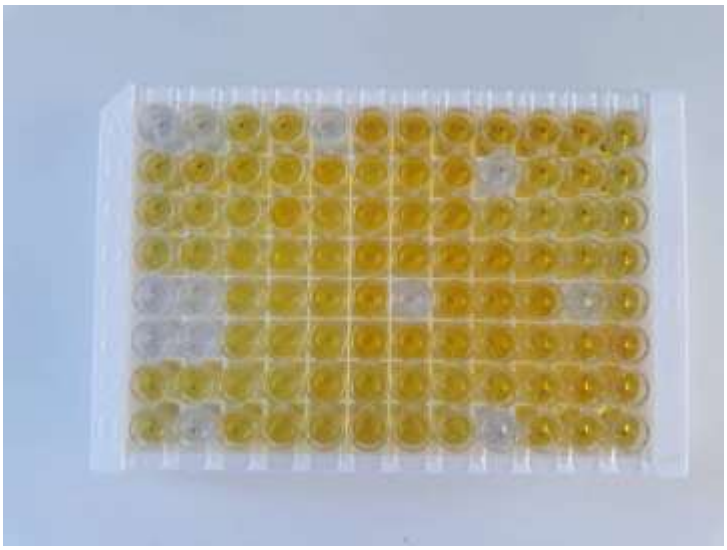
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	NC	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	NC	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	NC	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	PC	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	PC	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

B= blank, **NC**= negative control, **PC**= positive control, ■ = Sample HBc +

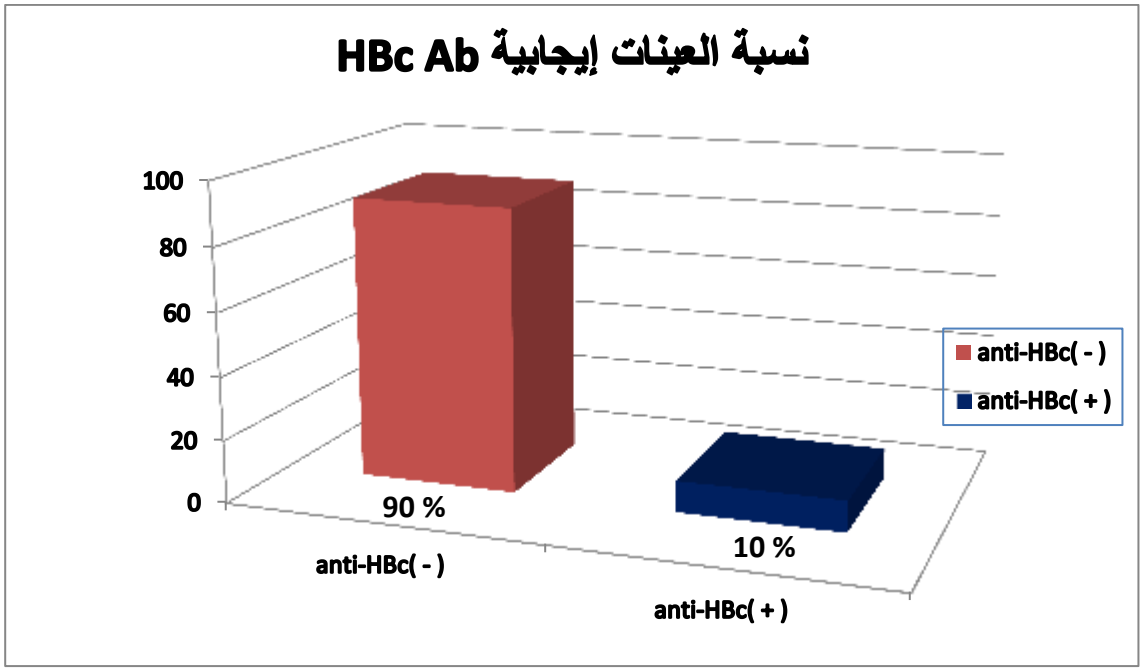
الشكل رقم (7): شكل ترسيمي لنتائج الدراسة يظهر العينات إيجابية HBc Ab

النتائج والمناقشة:

أظهرت النتائج إيجابية 9 عينات للأضداد الكلية للمستضد اللبي، أي بنسبة 10% من مجموع العينات التسعون المختبرة.



الشكل رقم (8): العينات الإيجابية و الشواهد (تبدو بلون فاتح)



الشكل رقم (9): مخطط بياني لنتائج الدراسة

تعتمد مراكز نقل الدم في سوريا على تحرّي العامل الأسترالي HBs Ag لكشف الإصابة بالتهاب الكبد B لدى المتبرعين، وتعتبر وحدات الدم صالحة للنقل إذا كان العامل الأسترالي سلبيّاً.

تشير إحصائيات منظمة الصحة العالمية WHO إلى وجود 350 مليون مصاب بالتهاب الكبد B حول العالم وإلى معدّل حدوث عدوى بالتهاب الكبد B بعد نقل الدم يتراوح من 0.07 إلى 18%، كما تشير نتائج كشف HBV DNA في الدم بتقنية PCR إلى أن 0.3 – 2.8 % من المتبرعين إيجابيي HBV DNA في المصل، ما يعني أن لديهم فيروسات جائلة في الدم وبالتالي يشير لتواجد نسبة معتبرة من الحالات تحت السريرية لدى المتبرعين. إنّ غياب إيجابية العامل الأسترالي في المصل لا يستبعد وجود HBV DNA في المصل فقد يكون المتبرع في فترة النافذة المصليّة (إصابة حديثة)، وبالتالي أهمية استقصاء HBc Ab وخاصةً أن كشف DNA الفيروس بتقنية PCR مكلف وقد يتعذر إجراءه لكل متبرع في سورية.

في دراستنا أُجري تحرّي للأضداد anti–HBc Total على 90 وحدة دم سلبية العامل الأسترالي مصنّفة كوحدات صالحة للنقل من قبل مركز نقل الدم في اللاذقية ، وقد اعتُمد في الدراسة استخدام تقانة ELISA التنافسية باستخدام كيت لشركة DIA Source (بلجيكا).

أظهرت النتائج معدّل إيجابية للأضداد anti– HBc Total بنسبة 10%.

إنّ هذه النسبة تشمل الحالات التالية:

- الأشخاص إيجابيي anti – HBc IgM (والذي يدل على إصابة حديثة بالفيروس)
- الأشخاص إيجابيي anti–HBc IgG (قد لا يكونوا بالضرورة مصابين إذا كان لديهم عيار عالي لأضداد العامل الأسترالي، حيث يكونوا ممنعين)

- الأشخاص المصابين سلبيي العامل الأسترالي بسبب وجود طفرات فيروسية، أو كون العامل الأسترالي دون الحد القابل للكشف.

وفي ما يلي جدول يوضّح نتائج المقارنة مع دراسات مشابهة في الدول المجاورة:

البلد	لبنان (Elzaatari, *et al.*, 2007)	مصر (Elzayadi, *et al.*, 2008)	السعودية (Zekri, *et al.*, 2002)
النسبة	% 11	% 10.3	% 21.5
البلد	إيران (Khorami, *et al.*, 2013)	تركيا (Findik, *et al.*, 2001)	
النسبة	% 8.3	% 20	

بينما يوضّح الجدول التالي نتائج المقارنة مع دول أخرى:

البلد	ألمانيا (Obrien, et al., 2007)	بريطانيا (Archer, et al., 1983)	الهند (Dhawan, et al., 2008)
النسبة	% 1.1	% 7	% 8.4
البلد	باكستان (Bhatti, *et al.*, 2007)	اليابان (Yuen, *et al.*, 2011)	تايوان (Ll,l *et al.*, 2008)
النسبة	% 17.28	% 3	% 0.11

ويمكن تفسير تفاوت النسب بين هذه الدراسات بالتنوع الجغرافي واختلاف الثقافات من حيث الوعي بطرق الوقاية وخاصة الاتصال الجنسي، حيث يفترض أنّ الأعمار 18 – 30 تتمتع بثقافة جيدة حول الوقاية من المرض، وكذلك الفروق الأثنية والعرقية.

وعموماً يمكن تصنيف معدّل انتشار إيجابية الأضداد anti – HBc في وحدات الدم سلبية العامل الأسترالي وفق التالي:

Low	Intermediate	High
أقل من 2%	2–8%	أكثر من 8%

وعليه تبعاً لنتيجة دراستنا فإنّ سوريا تقع ضمن البلدان ذات معدّل الانتشار العالي، ويبيّن أهمية التحرّي عن الأضداد HBC إلى جانب التحاليل المتبعة لضمان أمان وسلامة نقل الدم وهو ما أكّدت عليه منظمة الغذاء و الدواء العالميّة منذ عام 1991.

الاستنتاجات والتوصيات:

تؤكد نتائج دراستنا على ضرورة إعادة النظر في اجراءات التحري المصلي المعتمدة في مراكز نقل الدم والتي تقتصر على كشف المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد البائي. فسلبية العامل الأسترالي لا تستبعد انتقال العدوى الفيروسية عبر نقل الدم، وحماية المريض تحتم ضرورة إدخال اختبارات أخرى مصلية أو جزيئية و منها تحري الأضداد HBc بحيث تزيد إمكانية كشف العدوى الخفية في وحدات دم المتبرعين.

Reference:

1. ABDI, F.; NOVIN, M.G.; AFRAKHTEH, M.; KHORVASH, F. *Hepatitis B and Pregnancy: An update review article*. World Journal of Obstetrics and Gynecology, 2015, 4 (1): 1-8.
2. AGGARWAL, R. and RANJAN, P. *Preventing and treating hepatitis B infection*. BMJ, Nov 2004, 329 (7474): 1080–1086.
3. ARCHER, A.C.; COHEN, B.J. and MORTIMER, P.P. *The value of screening blood donors for antibody to hepatitis core antigen*. J Clin Pathol, 1983, 36: 924-928.
4. AL-MAHTAB, M.; AKBAR, S.F. and RAHMAN, S. *Comprehensive Textbook of Hepatitis B, 1st ed.* Jaypee Brothers Medical Publishers, 2011, 352 P.
5. BARON, S. *Medical Microbiology, 4th ed.* University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, 1996.
6. BHATTI FA, ULAH Z, SALAMAT N, AYUB M. and GHANI E. *Anti hepatits B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors* .implications for transfusion practice. Transfusion2007; 47 :74-79
7. BONINO, F.; PIRATVISUTH, T.; BRUNETTO, M.R. and LIAW, Y. *Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease*. Antiviral Therapy 2010, 15 Suppl 3: 35-44.
8. BROW, J.L.; CARMAN, W.F. and THOMAS, H.C. *The hepatitis B virus*. Bailliere's Clinical Gastroenterology. Volume 4, Issue 3, Sep 1990, P 721-747.
9. BUCKLEY, G.J. and STORM, B.L. *A national Strategy for the elimination of hepatitis B and C.* National Academies Press, Washington, 2017.
10. DENNIS, L.; KASPER, M.D. *Harisson's Principles of Internal Medicine 16th ed*. McGraw-Hill Professional, 2004.
11. DHAWAN, H.K.; MARWAHA, N.; SHARMA, R.R.; CHAWLA, Y.; THAKRAL, B.; SALUJA, K.; SHARMA, S.K.; THAKUR, M.K. and JAIN, A. *Anti – HBc screening in Indian blood donors : Still an unresolved issue.* World J Gastroenterol 2008, September 14, 14 (34) : 5327 – 5330.
12. EL-ZAATARI, M.; KAZMA, H.; MAJZOUB, N.M.; HAIDAR, M.;RAMLAWI, F.; MAHFOUD, Z. and RAMIA, S. *Hepatitis B virus DNA in serum of " anti-HBc only " positive healthy Lebanese blood donors : Significance and possible implications*. The Journal of Hospital Infection, 66 : 278-282, 2007.
13. EL-ZAYADI, A.R.; IBRAHIM, E.H.; BADRAN, H.M.; SAEID, A.; MONEIB, N.A.; SHEMIS, M.A.; ABDEL-SATTAR, R.M.; AHMADY, A.M. and EL-NAKEEB, A. *Anti-Hbc screening in Egyptian blood donors reduces the risk of hepatitis B virus transmission.* Transfusion Medicine, 18: 55-61, 2008.

14. FINDIK, D.; ARSLAN, U. and BAYKAN, M. *Determination of hepatitis B virus DNA incidence, viral load, and mutations in blood donors with HBs Ag and anti- HBs negative serology and antibodies to hepatitis B core antigen*. European Journal of Internal Medicine, 18 : 571-575, 2007.
15. GERLICH, W.H. *Medical Virology of hepatitis B: How it began and where we are now*. Virology journal, 2013.
16. GREENWOOD, D.; SLACK, R.; PEUTHERER, J. and BARER, M. *Medical Microbiology,17 th ed : A Guide to Microbial Infections*. Elsevier, 2007,738 P.
17. GUO, L.; WANG, D.; OUYANG, X.; TANG, N.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZHU, H. and LI, X. *Recent Advances in HBV Reactivation Research*. BioMed Research International Volume 2018, 9 Pages.
18. HUDU, S.A; HARMAL, N.S; SAEED,M.I; ALSHARI, A.S; MALIK, Y.A.; NIAZLIN, M.T.; HASSAN, R. and SEKAWI, Z. *Molecular and Serological detection of occult hepatitis B virus among healthy hepatitis B surface antigen –negative blood donors in Malaysia*. African Health Sciences, Vol 16, Issue 3, September 2016, 677-683.
19. IARC WORKING GROUP. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* Pharmaceuticals. Volume 100 A, 2012.
20. INAN, N. and TABAK, F. *Hepatitis B Virus : Biology and Life Cycle*. Viral Hepatitis Journal 2015, 21 (1) : 1- 7.
21. JAPHET, M.O.; ADESINA, O.A.; DONBRAYE, E. and ADEWUMI, M.O. *Hepatitis B core IgM antibody (anti-HBc IgM)among Hepatitis B surface Antigen (HBs-Ag) negative blood donors in Nigeria*. Virology Journal, 2011, 8:513.
22. JIANMING, H. and KUANCHENG, L. *Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles : Formation, Function and Application.* Viruses 2017, 9, 56.
23. KHORAMI, F.; SOBHANI, S.A; DAVOUDIAN, P. and KHAJEH, E. *Prevalence of HBc-Ab among HBs-Ag negative healthy blood donors in south of Iran*. Electronic Physician, Vol 5, Issue 3, Year 2013, 659-663.
24. Li L; Chen P.J.; Chen M.H.; Chak K.F.; Lin K.S. and Tsai S.JL . *A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus.* Transfusion., 2008;48(6):1198-206.
25. LOCARNINI, S. *Molecular Virology of Hepatitis B Virus*. Seminars in Liver Disease, Volume 24, Supplement 1, 2004.
26. MORTAZAVI, M.; ZARENEZHAD, M.; GHOLAMZADEH, S.; ALAVIAN, S.M.; GHORBANI, M.; DEHGHANI, R.; MALEKPOUR, A.; MESHKIBAF, M. and FAKHRZAD, A. *Bioinformatic Identification of Rare Codon Clusters (RCCs) in HBV Genome and Evaluation of RCCs in Proteins Structure of Hepatitis B Virus*. Hepat Mon, October 2016.
27. NETO, C.A.; STRAUSS, E.; SABINO, E.C.; SUCUPIRA,M.A. and CHAMONE, D.A. *Significance of Isolated Hepatitis B Core AntiBody in Blood Donors from Sao Paulo*. Rev. Inst. Med. trop,S.Paulo August 2001,203-208
28. O'BRIEN, S.F.; FEARON, M.A.; YI, Q.L.; FAN, W.; SCALIA, V.; MUNTZ, I.R. and VAMVAKAS, E.C. *Hepatitis B virus DNA – Positive, hepatitis B surface antigen – negative blood donations intercepted by anti –hepatitis B core antigen testing* : the Canadian Blood Services experience. Transfusion, 47 : 1809 – 1815, 2007.

29. PANDEYA, D.R.; YANG, Yu. and HONG, S.T. *Active Recombinant Reverse Transcriptase Domain of human Hepatitis B Virus Polymerase*. Biomedical Research, Volume 22, Issue 3, 2011
30. RAMIA, S.; RAMLAWI, F.; KANNAN, M.; KLAYME,S. and NAMAN,R. *Frequency and significance of antibodies against hepatitis B core (anti- HBc) antigen as the only serological marker for hepatitis B infection in Lebanese blood donors*. Epidemiol. Infect, 2005, 133, 695-699.
31. RYAN, K.J. and RAY, C.G. *Sherris Medical Microbiology*, *5th ed*, 2010.
32. SAPIRSTEIN, J. Drug Development, October, 2018.
33. World Health Organization. *Guidelines for the Prevention Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection*, 2015, 166 P.
34. Yuen M-F; Wong DK-H; Lee C-K; Tanaka Y; Allain J-P. and Fung. *JTransmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection*. Clinical Infectious Diseases.2011;52(5):624-
35. ZEKRI, A.N.; AWLIA, A.A.; EL MAHALAWI, H. ISMAIL, E.F. and MABROUK,G.M. *Evaluation of blood units with isolated anti HBc for the presence of HBV DNA.* Disease Markers, 18: 107 – 110, 2002.