

مدى تأثير الخلاصة الميثانولية لنبات زهرة الأفعى نوع *angustifolium* على بعض

أنواع البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام

Methanolic extract of *Echium angustifolium* effect on some types of bacteria gram positive and gram negative

د. إِمْحَدُ مُحَمَّدُ أَبُو خَتَالَةَ رجاء مصطفى أبو رويص

أم السعد مُحَمَّدُ طرطور هناء صالح أبو غولة تھاني عثمان الشحيح

الملخص:

تلعب النباتات الطبية دورا هاما في علاج العديد من الأمراض و تعتبر مصدر من مصادر الأدوية. وبجهد الدراسة تمت معرفة تأثير المستخلص الميثانولي لنبات زهرة الأفعى *Echium angustifolium*، حيث استخدمت تراكيز متفرقة من المستخلص 20 ملغم/مايكرو لتر، 23.63 ملغم/مايكرو لتر، 33 ملغم/مايكرو لتر) على التوالي وطبقت على أنواع من البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام (*Staphylococcus aureus*، *E.coli*، *Klebsiella*). حيث أظهرت النتائج أن جميع التراكيز لخلاصة اليوم الأول لم تعطي أي تثبيط للنمو البكتيري. في حين أن خلاصة اليوم الثاني والثالث لم تعط تثبيط للبكتيريا في التركيز (20 ملغم/مايكرو لتر) فقط. أما عند زيادة التركيز 13.63 ملغم/مايكرو لتر لخلاصة اليوم الثاني والثالث عند نسبة التركيز 50.78% لم تكن هناك نتيجة تذكر ولكن عند نسبة التركيز 69.22% أعطت هالة حول قرص ورقة الترشيح قدرت ب(8 ملم، 9 ملم) لليوم الثاني والثالث على التوالي على بكتيريا *Staphylococcus aureus*. في حين، عند تطبيقها على بكتيريا *Klebsiella* أعطت فقط نسبة التركيز 69.22% لخلاصة اليوم الثالث هالة قدرت ب(8 ملم. والنتيجة عند زيادة التركيز 33 ملغم/مايكرو لتر، بالنسبة لخلاصة اليوم الثاني وجد قطر الهالة المتكونة حول قرص ورقة الترشيح (8 ملم، 9 ملم عند نسبة التركيز 74.24%، 100.75% على التوالي) المطبقة على بكتيريا *Staphylococcus aureus* وأعطى قطر الهالة حول القرص المشبع بخلاصة اليوم الثالث بتركيز 33 ملغم/مايكرو لتر على بكتيريا *Staphylococcus aureus* (9 ملم عند 74.24%، 10 ملم عند 100.75%). وفي نفس الوقت، عند تطبيق خلاصة اليوم الثالث على بكتيريا *Klebsiella* كانت النتائج (74.24% أعطت 12 ملم و 100.75%

أعطت 13 ملم). بالتالي، وجد أن زيادة تركيز الخلاصة الميثانولية لنبات زهرة الأفعى يزداد تأثير التثبيط لأنواع البكتيريا الموجبة الجرام وسالبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: نبات زهرة الأفعى (حنة العقرب)، *Echiumangustifolium*، الخلاصة الميثانولية، بكتريا موجبة الجرام، بكتريا سالبة الجرام، تثبيط النمو البكتيري.

المقدمة Introduction:

معظم الأدوية الكيميائية التي نستخدمها اليوم مصدرها الأول الأعشاب الطبية، لاحتوائها في تركيبها على مواد مفيدة للقضاء على العديد من الأمراض، كما تتميز بعدم وجود مواد كيميائية ذات آثار جانبية عالية السمية كما في الادوية المصنعة كيميائيا. وبسبب نجاح تأثير المستخلصات النباتية علي نمو الأحياء المجهرية أجريت عدة دراسات حول تأثير المستخلصات النباتية على الميكروبات مثل مستخلصات بعض الأنواع من نبات زهرة الأفعى التي أظهرت تثبيطاً لبعض أنواع البكتيريا وعلاجاً لبعض الأمراض الأخرى (Mansion et al., 2009).

أشار Trpevski وآخرون (2008) إلى أن نبات زهرة الأفعى من النباتات الطبية التي تحتوي على مركب الفينول و الفلافونويد، وصنفت مجموع النباتات التي تحتوي المركب الفينول والفلافونويد عددها حوالي 20 نبات، يمكن استخدام أجزاء النبات كالأوراق والسيقان والأزهار، وتلعب المركبات الفينولية والفلافونيدات المستخلصة دوراً مهماً لتثبيط الميكروبات (Trpevski et al., 2008).

لوحظ من دراسة للعالم Eruyqur وآخرون (2016) سابقة أن نبات زهرة الأفعى أعطى فعالية تثبيطية لبعض الميكروبات مثل *E.italicum* و *E.vulgaiel* و *E.angustifolium* واستخدم الجذور واللحاء. وأشارت الدراسة أيضا على أن نبات زهرة الأفعى يساعد في التئام الجروح وتنشيط الخلايا للنمو كما أشار إلى أن جذور نبات زهرة الأفعى المستخلص بالإيثانول بتركيز 1% يساعد في التئام الجروح بنسبة (*E.angustifolium* 37.38%)، (*E.vulgaiel* 40.97%)، (*E.italicum* 35.29%) (Eruyqur et al., 2016).

نبات زهرة الأفعى يملك القدرة الفائقة بتأثيره المضاد للنشاط البكتيري يعطيه إمكانية استخدامه في تطهير الجروح وتضميدها نقلاً عن Mohsen Abolhassani (2004) فإن نبات زهرة الأفعى يملك تأثيراً قاتلاً للجراثيم عند وضعه على الجروح المتقرحة والجروح السطحية الملتهبة.

يهدف هذا البحث إلى دراسة مدى تأثير المستخلص الميثانولي لنبات *Ehcium angustifolium* في الحد من نشاط البكتيريا موجبة جرام وسالبة جرام، وكذلك التعريف بأهمية استخدام هذا المنتج دون اللجوء للأدوية الكيميائية الطبية التي تسبب المضاعفات والضرر للإنسان.

المواد والطرائق **Materials and Methods**:

1.2 دراسة النبات **Plant study**:

تم جمع نبات زهرة الأفعى المتوفرة داخل أسوار كلية التقنية الطبية بمدينة مصراتة خلال فترة الصباح الباكر خلال شهر مارس 2016. وقد غسلت وجففت كمية منها في درجة حرارة الغرفة لمدة ثمانية أسابيع، بعدها طحنت بمطحنة كهربائية وحفظ المسحوق في قنينة زجاجية لحين استخدامه.

2.2 تحضير المستخلص الميثانولي **Preparation of Methanolic extract**:

حضر المستخلص النباتي بالطريقة النقع البارد بالميثانول، بتركيز 99.8% على ثلاثة مراحل متتالية.

حضر المستخلص بوضع الخليط في الجهاز الهزاز *shaker* لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، وبعدها رشح المخلوط، وتم وضع الراشح في جهاز التبخير الدوار للتخلص من الميثانول بدرجة حرارة 65-70 م° طبقاً لدراسة (Ananth, 2013). نقع الجزء النباتي تم تكراره بكمية مقدرة بالميثانول وإعادة نفس الطريقة للحصول على الخليط والراشح والخلاصة لليوم الثاني واليوم الثالث على التوالي.

تم وزن المستخلص النباتي بعد عملية التبخير وتخزينه في الثلاجة لاستخدامه في التجربة كما في الجدول (1).

جدول 1: أوزان المستخلص النباتي:

اليوم الثالث	اليوم الثاني	اليوم الأول	المستخلص النباتي بالأيام
0.635 غم	0.522 غم	1.431 غم	أوزان المستخلص الجاف/غم

3.2 تحضير الوسط الغذائي **Preparation of Mueller Hinton agar**:

مزج 1 غم من الوسط الغذائي *Mueller Hinton agar* في محلول 500 مل من الماء المقطر، وضعت في جهاز التعقيم الأوتوكليف.

4.2 تحضير التراكيز **Stock of concentration**:

تم تحضير ثلاثة تراكيز أساسية (20 ملغم/مايكرو لتر، 23.63 ملغم/مايكرو لتر، 33 ملغم/مايكرو لتر) لمستخلص كل يوم على حدة، كما هو مبين بالجدول رقم 2. لتحضير التركيز الأول 20 ملغم/مايكرو لتر تم مزج 20 ملغم من مسحوق المستخلص النباتي لليوم الأول والثاني والثالث مع 100 µl من محلول (Dimethyl Sulfoxide) DMSO على التوالي. واستخدم التركيز 20 ملغم/مايكرو لتر مباشرة في اختبار الفعالية التثبيطة ضد أنواع البكتيريا مثل *E.coli* و *Staphylococcus aureus* و *Klebsella*.

5.2 خطوات العمل **procedure**:

استخدمت أقراص من ورق ترشيح، تم تشبييعها بواسطة ماصة قياسية بنسب مئوية (12.5%، 37.5%، 50%) من المستخلص النباتي لليوم الأول، و تم تشبييع قرص آخر ب 55 مايكرو لتر من مذيب DMSO كضابط. تم أخذ 3 أطباق من الميديا المحضرة مسبقا (Mueller Hinton agar)، وزرع على كل طبق نوع من البكتيريا (*E.coli* و *Klebsella aureus* و *Staphylococcus aureus*) على التوالي وتم تقسيم كل طبق إلى أربعة أقسام على عدد التراكيز المطبقة على أقراص ورق الترشيح والقرص المشبع بمحلول DMSO، وبالتالي تم وضعها في الحاضنة Incubator لمدة 24 ساعة. طبقت نفس الخطوات السابقة باستخدام خلاصة اليوم الثاني والثالث، وأخذت النتائج بعد مرور 24 ساعة. بالتالي تم تطبيق الطريقة نفسها مع التركيز الثاني (23.63 ملغم/مايكرو لتر) و التركيز الثالث (33 ملغم/مايكرو لتر) كما هو موضح بالجدول رقم 2. جدول 2: التراكيز المستعملة من المستخلص وأنواع البكتيريا التي طبقت عليها التراكيز

أنواع البكتيريا	حسب % للتركيز	التراكيز الأساسية ملغم/مايكرو لتر	حسب الأيام	المستخلص الميثانولي
<i>E.coli</i> و <i>Staphylococcus aureus</i> و <i>Klebsella</i>	12.5	20	اليوم الأول	
	37.5			
	50			
	50.78	23.63		
	69.22			
	74.24			
	100.75	33		

E.coli و Staphylococcus aureus و Klebsiella	12.5	20	اليوم الثاني
	37.5		
	50		
	50.78	23.63	
	69.22		
	74.24		
	100.75	33	
E.coli و Staphylococcus aureus و Klebsiella	12.5	20	اليوم الثالث
	37.5		
	50		
	50.78	23.63	
	69.22		
	74.24		
	100.75	33	

النتائج والمناقشة Results and discussions:

طبقاً إلى النتائج التي توصلت إليها هذه الدراسة كما هو في الجدول (3)، أن في تركيز 20 ملغم/ مايكرو لتر للخلاصة الميثانولية لليوم الأول والثاني والثالث لنبات زهرة الأفعى *Echiumangustifolium* لم تظهر أي تأثير عند تطبيقها على نوعين من البكتيريا *E.coli* و *Staphylococcus aureus* حيث أبدت البكتيريا مقاومة للخلاصة، وتمت بشكل طبيعي دون تأثير كما في الدراسات الأخرى عندما تم تطبيق مستخلص الكلوروفورم ومستخلص الإيثانول لنبات زهرة الأفعى نوع *Echium angustifolium* بتركيز متفرقة (0.5، 0.20، 0.80، 0.90، 100، 200، 300 مايكرو لتر) على أربعة أنواع من البكتيريا الممرضة *E.coli* و *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella spp* و *Strepto pyogenes* ، وجد أن مستخلصات الإيثانول والكلوروفورم في التراكيز القليلة والعالية ليس لها تأثير، ولم تعط أي مقاومة للنمو البكتيري. ربما يعود السبب إلى أن المذيب الكحولي غير قادر على استخراج المركبات الكيميائية بالنبات الفعالة ضد الجراثيم مما أدى إلى فقدان قابلية المستخلص في التأثير التثبيطي (Jefferson, 1987).

في حين أن الدراسة الحالية أثبتت أيضا أنه عند استخدام تركيز 13.63 ملغم/ مايكرو لتر من المستخلص الميثانولي لنبات زهرة الأفعى لليوم الأول لم تعط أي نتيجة عندما طبقت على البكتيريا المستعملة للدراسة على الرغم من زيادة التراكيز. وكذلك لم تظهر التراكيز المختلفة من الخلاصات المتكررة أية نتائج عند تطبيقها على بكتريا نوع *E.coli*.

من جهة أخرى، عند تطبيق التركيز 13.63 ملغم/ مايكرو لتر خلاصة اليوم الثاني أعطت هالة حول قرص ورقة الترشيح قدرت ب 8 ملم وخلاصة اليوم الثالث أعطت هالة قدرت ب 9 ملم عند تطبيقهما على بكتيريا *Staphylococcus aureus*. وأعطى نفس التركيز خلاصة اليوم الثالث هالة قدرت ب 8 ملم عند تطبيقها على بكتيريا *Klebsiella*. وعلى ضوء النتيجة السابقة تم زيادة التركيز 33 ملغم/ مايكرو لتر، وطبقت خلاصة اليوم الثاني على بكتيريا نوع *Staphylococcus aureus* فأظهرت أن هناك فروقات بسيطة ظاهرة بين الأقل تركيزًا والأعلى تركيزًا من خلاصة التركيز الأساسي، حيث وجد قطر الهالة المتكون حول قرص ورقة الترشيح المشبع بتركيز الخلاصة الميثانولية بعد 24 ساعة في الحاضنة 8 ملم، 9 ملم عند نسبة التركيز 74.24%، 100.75% على التوالي.

بالتالي، عند تطبيق خلاصة اليوم الثالث باستعمال التركيز 33 ملغم/ مايكرو لتر على بكتيريا *Staphylococcus aureus* بالتركيز الأقل 74.24% أظهر قطر الهالة 9 ملم في حين كانت 10 ملم بالتركيز الأعلى 100.75%. وفي نفس الوقت عند تطبيق خلاصة اليوم الثالث على بكتيريا *Klebsiella* وجد أنها أعطت نتائج جيدة لإظهار مدى قدرة الخلاصة الميثانولية على مقاومة نمو البكتيريا السالبة نوع *Klebsiella* حيث كانت النتائج كالتالي: 74.24% أعطت 12 ملم وتركيز 100.75% أعطت 13 ملم. وهذا يتطابق مع دراسة أجراها الدكتور محسن أبو الحسيني في جامعة طهران (2004) على الخلاصة المائية لنبات زهرة الأفعى نوع *Echium amoenum*، وجد أن التأثير المضاد للمستخلص على البكتيريا نوع *Staphylococcus aureus* يعتمد على زيادة التركيز (Abolhassani, 2004). يدل ذلك على أن استعمال المذيب الميثانولي حفز نبات زهرة الأفعى على استخلاص المركبات الفينولية *Naphthoquinones* التي يعزى لها التأثير المضاد للنمو البكتيري والفطري (Zhu et al., 2016 & Babula et al., 2007). لهذا السبب أعطى مستخلص اليوم الثاني و الثالث نتائج تثبيطية عند تطبيق التراكيز العالية منه على النمو البكتيري كما يوضحه جدول رقم 3 و الشكل رقم 1 و الشكل 2 و الشكل 3.

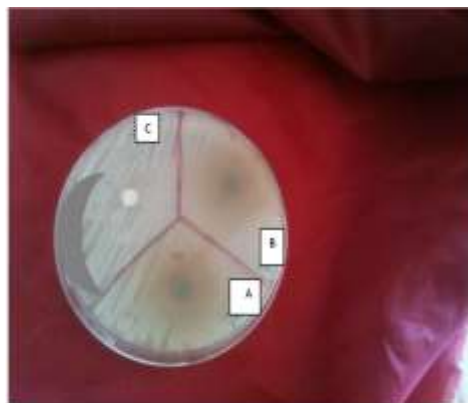
جدول 3: يوضح فعالية المستخلص الميثانولي لنبات زهرة الأفعى (القراءات تمثل معدل ثلاث

تراكينز)

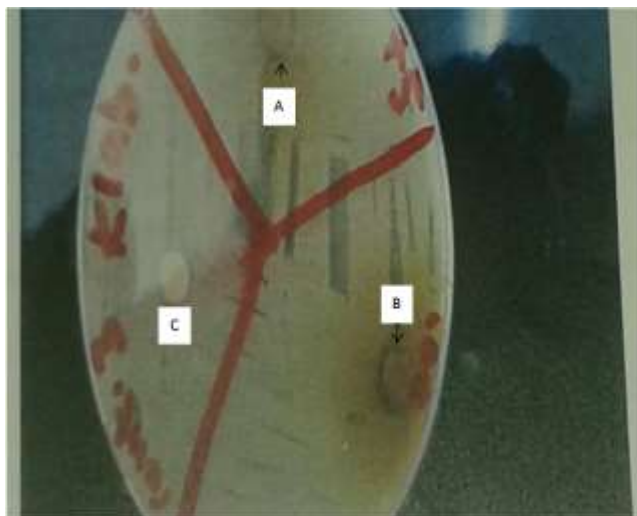
التأثير التثبيطي للمستخلص على أنواع البكتريا المستعملة (ملم)			المستخلص الميثانولي		
Klebsiella	Staphylococcus aureus	E.coli	حسب % للتراكيز	التراكيز الأساسية ملغم/مايكرو لتر Concentration stock	حسب الأيام
-	-	-	12.5	20	اليوم الأول
-	-	-	37.5		
-	-	-	50		
-	-	-	50.78	23.63	
-	-	-	69.22		
-	-	-	74.24		
-	-	-	100.75	33	
-	-	-	12.5	20	اليوم الثاني
-	-	-	37.5		
-	-	-	50		
-	-	-	50.78	23.63	
-	8	-	69.22		
-	8	-	74.24		
-	9	-	100.75	33	
-	-	-	12.5	20	اليوم الثالث
-	-	-	37.5		
-	-	-	50		
-	-	-	50.78	23.63	
8	9	-	69.22		
12	9	-	74.24		
13	10	-	100.75	33	



شكل 1: الفعالية التثبيطية لمستخلص اليوم الثاني لنبات زهرة الإصع ضد نمو بكتريا *Staph aureus* A) تركيز 8% B) تركيز 9% C) التحكم



شكل 2: الفعالية التثبيطية لمستخلص اليوم الثالث لنبات زهرة الإصع ضد نمو بكتريا *Staph aureus* A) تركيز 75% B) تركيز 10% C) التحكم



شكل 3: الفعالية التثبيطية لمستخلص اليوم الثالث لنبات زهرة الإصع ضد نمو بكتريا *Klebsiella sp.* A) تركيز 75% B) تركيز 13% C) التحكم

الاستنتاج Conclusion:

نستنتج من هذه الدراسة أن المستخلصات الميثانولية للنباتات تعطي تأثيراً فعالاً ضد النمو البكتيري، حيث أثبتت النتائج أن زيادة التركيز للمستخلص الميثانولي المطبق على أنواع البكتريا موجبة الجرام وسالبة الجرام له فعالية وأعطى تأثيراً تثبيطياً واضحاً عند التدرج في رفع مقدار التركيز.

المراجع References

- Ananth, A. (2013) phytochemical analysis of *Datura Stramonium* L.as apotential medicinal tree:An overview .International jouwnal of pharnaceutrcal Science and Health Care.5(3).pp:12-18.
- Babula, P., Adam, V., Havel, L., Kizek, R. (2007) Naphthoquinones and their pharmacological properties. PubMed. 56(3). pp: 114-20.
- Berti, M., Johnson, B.L., Dash, S., Fischer, S., Wilckens, R. and Hevia, F., 2007. *Echium*: a source of stearidonic acid adapted to the northern great plains in the US. Issues in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, pp.120-125.
- Eruygur, N., Yilmaz, G., Kutsal, O., Yücel, G., Üstün, O. (2016) Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from *Echium* species growing in Turkey. J Ethnopharmacol. 5(185). pp: 370-376.
- Jafri, S., El-Gadi, A. (1979). Flora of Libya, Tropli University, Tripoli. 68 (1979). pp: 33-49.
- Jafri.M.H. Safaeian, L., Tameh, AA., Ghannadi, A., Naghani E., Tavazoei , H., Alavi, S. (2015), Protective effects of *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. against cerebral ischemia in the rats. Adv. Biomed Res. 4(29). pp: 107.
- Jefferson, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant molecular biology reporter, 5(4), pp.387-405.
- Mansion, G., Selvi, F., Guggisberg, A. & Conti, E. (2009) Origin of Mediterranean insular endemics in the Boraginales: integrative evidence from molecular dating and ancestral area reconstruction. Journal of Biogeography. 36 (2009), pp: 1282–1296.
- Vancouver Trpevski, M., Spasenoski, M., Pavlova, V., Lozanovska, I., Talevska, A., Ugurovska, D. & Gadzovska , S. (2007) Phenolic And Flavonoid Contents Of Some Medicinal Plants From Jablanica MT., Republic Of Macedonia. Proceedings of the Iii Congress of Ecologists of Macedonia. Pp: 40- 46.
- Zhu, X., Skoneczny, D., Weidenhamer, J., Mwendwa, J., Weston, P., Gurr, G., Callaway, R., Weston, L. (2016) Identification and localization of bioactive naphthoquinones in the roots and rhizosphere of Paterson's curse (*Echium plantagineum*), a noxious invader. PubMed. 67(12). pp: 3777-88.

Comparison of the prevalence and trends of Hepatitis B among blood donors in Tripoli, Misurata and Zleetin cities: Two years before and after Libyan incidences

Mohamed Ben-Hasan, Mohamed Moafa and Mohamed Alghazal

College of Medical Technology - Misurata

E,mail; benhasan672003@yahoo.com

Abstract

Hepatitis B virus is considered as a serious public health problem. Infection of this virus might lead to more serious clinical consequences. This study was conducted to estimate and compare the prevalence and trend of HBV infection among blood donors of three cities in Libya, Tripoli, Misurata and Zleetin and to explore the effect of Libyan incidences on the trend of the infection. A retrospective study was carried out on 72146 nationwide voluntary blood donors in four blood banks, covering the three cities over a period of four years (2009-2013), where serologic screening assay for HBsAg was performed. Findings showed statistically significant differences ($P < 0.05$) in the prevalence of the virus among the cities over the period mentioned. Results also indicated an increasing trend in the overall prevalence of the virus in Tripoli and decreasing trend in Misurata and Zleetin ($P > 0.05$) after Libyan incidences with no statistically significant difference. Sensitive tests such as nucleic acid amplification are recommended for more accurate results.

Introduction

Hepatitis B is known as blood-borne infection caused by hepatitis B virus and considered as a common serious public health problem especially in developing countries (1). The genome of hepatitis B virus (HBV) is a circular double stranded DNA of $< 3,200$ nucleotides (2). The transmission of the infection of this virus is mainly by blood to blood contact such as, re-use of contaminated needles, sexual contact, dental procedures and vertical transmission from mother to child (3,4). Infection of this virus might finally lead to more serious disease such as a hepatocellular carcinoma (5). Routine tests for blood donors to screen HBV and HCV is done worldwide for a safe blood transfusion and preventing serious clinical consequences (6,7,8). Hepatitis B has been known as one of the most deadly infections. The age of infection with HBV inversely affect the progression of the infection from acute to chronic (9). It was reported that up to 90% of infants who infected from their mothers at birth develop chronic infection whereas only 5% become chronically infected in adults

with acute infection from HBV (10). Despite the immunity developed by patients (87–90%) infected with HBV to eliminate infection (11), about 370 million chronic infections were estimated worldwide (12). The fatality of HBV-related diseases was estimated to be 600,000 annually (13). A high prevalence of HBV was reported in regions such as south East Asia, sub-Saharan Africa and china (14). The aims of the present study are to estimate and compare the prevalence of HBV infection among blood donors in three western cities of Libya, Tripoli, Misurata and Zleetin and to explore the effect of Libyan incidences on the trend of the infection. In addition, this study analyzes the risk factors which could associate with higher prevalence. Results of the study may also display a good indication to the overall prevalence of HBV in Libya, since the cities where this study was conducted represent nearly half of the population.

Material and Methods

This retrospective study was carried out in three Libyan western cities, Tripoli, Misurata and Zleetin, over a period of 4 years between January 2009 and December 2013. The year 2011 was not included because of inaccurate records due to the Libyan incidences. These cities were chosen as they comprise more than two third of western cities and nearly half of Libyan population. A total of 72146 voluntary blood donors who were declared physically fit for transfusion were screened for HBV using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The assay was done using HBsAg ELISA version 1 kit (BioTek, USA), which based on the one-step sandwich method. In Tripoli, 32098 blood volunteers were screened at the blood bank of Tripoli Medical Centre (TMC), and in Zleetin 13467 screened at the Central Hospital of Zleetin, while in Misurata, 19836 at the National Cancer Institute (NCI) and Misurata Medical Centre (MMC).

Statistical Analysis

Data were entered into Microsoft Excel spreadsheets and analyzed by means of the statistical package for social sciences (SPSS-PC version 17.0, computer software). The overall prevalence of HBV among the three cities was compared using ANOVA test. Post Hoc LSD test was performed to address cities with significantly different prevalence. The difference in the prevalence before and after Libyan incidences was analysed using paired t-test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Results

The number of blood donors with positive HBsAg in the whole area of the study was 496 showing a prevalence of 0.69%. In Tripoli, the number of blood donors found to be positive for HBsAg was 287 from total blood donors of 32098, giving an overall prevalence of 0.89% (Fig. 1). The number of infected donors in the year 2009 was found 77 from a total of 8754 blood donors, showing a prevalence of 0.87%.

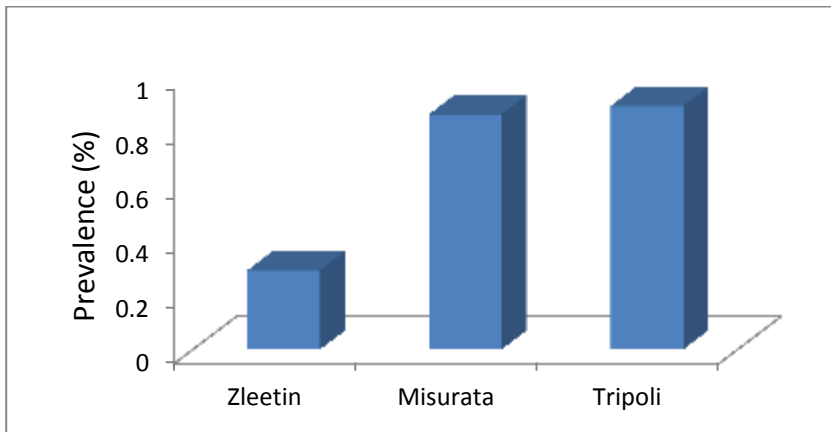


Fig.1- The overall prevalence of HBV over four years of the study. The x-axis represents the percentage of overall prevalence while y-axis represents cities of the study

The prevalence in the year 2010 was 0.74% but subsequently increased to 0.78% in 2012 and reached 1.18% in 2013 (Fig. 2).

In Misurata, the number of positive HBsAg donors was 170 from a total number of 19836, representing an overall prevalence of 0.86% (Fig. 1). The prevalence of HBV through were 1% in 2009, 1.14% in 2010 and dropped to 0.71% and 0.66% in 2012 and 2013, respectively (Fig. 2).

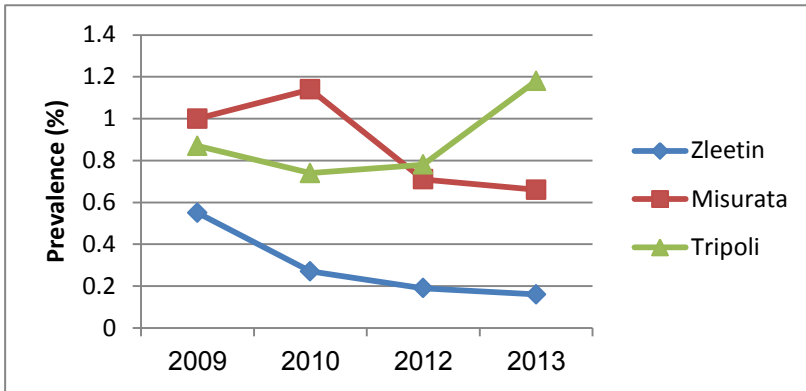


Fig.2- Trend of the prevalence of HBV in the three cities over four years of the study

The x-axis represents the percentage of overall prevalence while y-axis represents years of the study

In Zleetin, the overall prevalence of HBV was 0.29% corresponding to 39 Positive HBsAg blood donors (Fig. 1). The prevalence of HBV was 0.55% in 2009 and gradually decreased to 0.16% in 2013 (Fig. 2).

The difference in the overall prevalence of HBV between Zleetin and Tripoli, and between Zleetin and Misurata was statistically significant ($P < 0.05$), while between Tripoli and Misurata was not significant ($P > 0.05$).

The prevalence of the infection when compared two years after Libyan incidences in 2011 with two years before was found to be increased in Tripoli, while decreased in Misurata and Zleetin. The difference in the overall prevalence after and before Libya incidences in 2011 was found to be not significant ($P > 0.05$).

Discussion

The availability of safe blood transfusion is needed in all countries to prevent common serious complications, such as HBV infection. In developed countries, reduction of unnecessary transfusions, recruitment of regular blood volunteers and screening for blood transmissible infections has prevented transfusion-transmitted infections (15). However, such interventions are not applied uniformly in many developing countries and, therefore, the risk of blood-transmissible infections remains high (16). Statistics released by World Health Organization (WHO) have revealed that 80% of world population can have access to only 20% of the world's safe blood supply (17). Studying the prevalence of HBV in blood banks

gives a good indication to its prevalence in the whole city due to the big number of volunteer blood donors. In the cities of the current study, the blood donors were all volunteers or from the relatives and friends of the blood recipient.

The study showed an overall prevalence of 0.89%, 0.86% and 0.29% in Tripoli, Misurata and Zleetin, respectively, with an overall prevalence of 0.68% in the total area of the study. It was reported that areas of low endemicity, where the prevalence of HBsAg is less than 1%, account for about 12% of the world's population (18). The low prevalence of HBsAg obtained in the three cities qualifies the cities and all area of the study as a low prevalence area (less than 2%), according to the WHO classification (19). Moreover, these results might, to some extent, reflect the overall prevalence of this infectious disease in Libya, since the area of the study comprises nearly more than half of the Libyan population..

Higher prevalences of the disease compared to area of the study were reported worldwide. For instances, 1.18% in New Delhi (20), 1.4% in North Region of Jordan (15), 6.25% in Nyala- Sudan (21), 10.9 % in Jijiga -Eastern Ethiopia (22) and 13.3% in Nairobi- Kenya (12).

The low prevalence of this infectious disease in the three cities might be considered as a reflection to people awareness, availability of vaccination, religion, social cohesion and literacy in the country.

The prevalence of HBsAg in Tripoli city was the highest among the three cities of the study. Moreover, an increasing trend of the prevalence in the city was noticed over the four-year period of the study. The least overall prevalence was found in Zleetin city with a decreasing trend noticed over four-year period of the study. Misurata was observed to be with slightly lower prevalence than Tripoli and higher prevalence compared to Zleetin. However, the city showed a decreasing trend of the prevalence in the last three year-period of the study.

The least overall prevalence in Zleetin can be attributed to the small size and low population of the city which led to limiting drug trafficking and reducing the number of illegal immigrant infected by HBV.

Most infections of HBV low endemic areas are acquired by using of intravenous drug or unprotected sexual activities (23). The instability, and absence of law after Libyan incidences in 2011, which motivated sexual violence and rape might contributed to the increasing trend in Tripoli. Moreover, illegal immigrants, who might be infected with the virus and involved in drug dealing, may also contributed to the increasing trend. In

contrast, the decreasing trend of the infection in Misurata and Zleetin may be due to being relatively stable cities after the Libyan incidences.

Limitation of the current study was the use of only HBsAg detection to determine the prevalence of the infection. During the period between disappearance of HBsAg and appearance of HBs antibodies "window phase", hepatitis B core antibodies (anti-HBc) are the only serum marker of acute hepatitis B infection (24). It was reported that HBV can be transmitted from positive anti-HBc and negative HBsAg person when transfused (25, 26) and therefore, the prevalence of the virus will be increased. Moreover, earlier detection of the virus using sensitive tests such as nucleic acid amplification (15) should have been done for more realistic results.

Conclusion

The prevalence of HBV infections among blood donor in the area of the study is low which could give an impression to a low prevalence of the infection in Libya. Zleetin has the lowest prevalence of the virus among the three cities. Although the prevalence of the virus was increased in Tripoli and decreased in Misurata and Zleetin after Libyan incidences, the differences are statistically not significant.

Acknowledgment

Special thanks go to Mr. Morad Sahal, BSc in Medical Laboratory, from Misurata central hospital for helping us with the data collection from Zleetin and Tripoli blood banks, and Dr. Deyadeen Alshibani for helping us with the statistical analysis.

References

Kalepoto GN, Bhally HS, Khaliq G, et al. Epidemiology of blood-borne viruses. A study of health blood donors in southern Pakistan. J. Pak. Med. Assoc. 1996; 27: 703-6.

Rehermann B and Nascimbeni M. Immunology of Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection. Nature Publishing Group. 2005; 5: 215-229.

Ishak KG. Pathologic features of Chronic Hepatitis. Am. J. Clin. Path. 2000; 11: 40-55.

4- Kumar et al. Robbin and Cotran pathologic basis of disease, Elswvier 7th ed. 2005: 891-898.

Nazar H, Nadia N, Shazia N, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C in blood donors in Karachi. Biomedica. 2008; 24: 116-117.

- 6- Kaur P and Basu S. Transfusion-transmitted infections: existing and emerging pathogens. *J Postgrad Med.* 2005; 51 (2):146-51.
- 7- Bihl F, Castelli D, Marincola F, et al. Transfusion transmitted infections. *J Transl Med.* 2007; 5:25.
- 8- Salawu L, Bolarinwa RA, Adegunloye AB, et al. HBsAg, anti-HCV, anti-HIV and VDRL in blood donors: Prevalence and trends in the last three and a half years in a tertiary health care facility in Ile-Ife, Nigeria. *International Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2010; 2 (11): 335-34.
- 9- Hwang EW and Cheung R. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *N A J Med Sci.* 2011; 4 (1): 7-13.
- 10- McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis.* 1985; 151(4): 599-603.
- 11- Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine.* 2012; 30: 2212– 2219.
- 12- Kerubo G, Khamadi S, Okoth V, et al. Hepatitis B, Hepatitis C and HIV-1 Coinfection in Two Informal Urban Settlements in Nairobi, Kenya. *PLoS ONE.* 2015; 10 (6): e0129247.
- 13- Goldstein S T, Zhou F, Hadler S C, et al. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *International Journal of Epidemiology.* 2005; 34: 1329–1339.
- 14- Sheriff HA. Prevalence of Hepatitis B and C Among Normal Individuals in

- Tripoli/Libya. AJPS. 2010; 8 (2): 104-109.
- 15- Abed Al-Gani F. Prevalence of HBV, HCV and HIV-1, 2 infections among blood donors in Prince Rashed Ben Al-Hassan Hospital in North Region of Jordan. Int J Biol Med Res. 2011; 2 (4): 912-916.
- 16- Gurol E, Saban C, Oral O, et al. Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. Eur J Epidemiol. 2006; 21 (4): 299-305.
- 17- Lee HH and Allain JP. Improving blood safety in resource-poor settings. Vox Sanguinis. 2004; 87 (2):176-179.
- 18- Hwang EW and Cheung R. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. N A J Med Sci. 2011; 4 (1): 7-13.
- 19- Singh K, Bhat S and Shastry S. Trend in seroprevalence of Hepatitis B virus infection among blood donors of coastal Karnataka, India. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(5): 376-79.
- 20- Makroo RN, Hegde V, Chowdhry M, et al. seroprevalence of infectious markers & their trends in blood donors in a hospital based blood bank in north india. Indian J Med Res. 2015; 142: 317-322.
- 21- Abou MA, Eltahir YM and Ali AS. Seroprevalence of Hepatitis B virus and Hepatitis C virus among blood donors in Nyala, South Dar Fur, Sudan. Virology Journal. 2009; 6:146.
- 22- Mohammed Y and Bekele A. Seroprevalence of transfusion transmitted infection among blood donors at Jijiga blood bank, Eastern Ethiopia: retrospective 4 years study. BMC Res Notes. 2016; 9:129.
- 23- Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East

Asia. Gut. 1996; 38(2):18-23.

24- Al-Mekhaizeem KA, Miriello M and Sherker AH. The frequency and significance of isolated hepatitis B core antibody and the suggested management of patients. CMAJ.

2001; 165(8): 1063-1064.

25- Hoofnagle JH, Seefe LB, Bales ZB, et al. Type B hepatitis after transfusion with

blood containing antibody to hepatitis B core antigen. N Engl J Med . 1978; 298:

1379- 1383.

26- Tegtmeir G, Henderson S, McNamara A, et al. Contribution of anti-HBc screening to

blood safety at a regional blood center in the United States. Transfusion. 1997; 37

(9S): 110s [abstract439].