



## Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v39i2.3324>

PROCEEDINGS OF  
**PIB**  
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

## Detection of HBsAg and serotypes in blood plasma of HBV-positive individuals in Mongolia

Damdinbazar DOLGION<sup>1</sup> , Byambajav BOLORTUYA<sup>1</sup> , Toshiaki OTSUKA<sup>2</sup> , Magvansuren TSERENDEJID<sup>3</sup> , Namjil ERDENEBAYAR<sup>3</sup> , Tsendsuren OYUNSUREN<sup>1</sup> , Davaakhuu GANTULGA<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

<sup>2</sup>Institute of Immunology, Tochigi, Japan

<sup>3</sup>National Center for Transfusion Medicine, Ulaanbaatar, Mongolia

\*Corresponding author: gantulgad@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0003-3792-7101>

**Abstract.** Mongolia has the highest liver cancer incidence in the world, primarily attributed to hepatitis virus infections and the prevalence of liver diseases. The predominant focus in existing studies involved the detection of virus infections, and immunization against HBV, with HBsAg serving as a primary marker. In this study, blood donation samples were evaluated, which were positive for HBV and negative for HCV, HAV, HIV, and syphilis by ELISA test at the National Center for Transfusion Medicine (NCTM) of Mongolia. Furthermore, titer determination was performed by reverse passive hemagglutination (PHA) assay, and the antigen serotype was identified on an isolated HBsAg. Our result showed that, among 83 HBV-positive blood plasmas, 10 exhibited a high HBsAg titer, and the serotypes ayr and ayw were identified. The samples were categorized into groups A and B, and to analyze HBsAg reliability, the prototype models were assembled using HBsAg isolated from the high antigen yield group (A). As a result, the prototype models were stable in 3 months, but the sensitivity and specificity of the antigen were weaker compared to its standard.

**Keywords:** serotype, antibody titer, prototype

Received 05 October 2023; received in revised form 28 October 2023; accepted 15 November 2023

© 2023 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### Introduction

Mongolia is considered a region with a high endemicity of viral hepatitis. According to Global Burden of Disease data from 2020, Mongolia has the highest estimated incidence rate of hepatocellular carcinoma (85.6/100 000) [1]. This elevated incidence is attributed to hepatitis B virus (HBV) (34%), hepatitis C virus (HCV) (46%), and co-infections of HBV and HCV (14%) [2].

HBV infection can lead to both acute (short-term, severe) and chronic (long-term) hepatitis in humans [3]. The virus is transmitted through infected blood, body fluids, medical needles, and from mother to child during pregnancy or birth [4]. HBV-infected individuals often remain asymptomatic until the virus progresses to acute hepatitis, liver cirrhosis, or hepatocellular carcinoma, presenting a significant global health concern [5].

HBV is a DNA virus, classified within the Hepadnaviridae family [6]. It contains 3 primary structural immunogenic antigens: the surface antigen

(HBsAg), core antigen (HBcAg), and e antigen (HBeAg) [7]. It is known that HBV is classified into 4 major subtypes (serotypes) based on antigenic epitopes present on its envelope proteins: adr, adw, ayw, and ayr, [8] and comprises 10 major genotypes (A to J) that exhibit nucleotide differences of more than 8% across full-length genotypes [9] (**Table 1**). These genotypes and serotypes demonstrate a geographic correlation [9], which is a significant consideration in predicting actions associated with chronic HBV infection [10].

The diagnosis of HBV infection is based on the detection of these antigens or the corresponding antibodies produced during and after infection. Among these, HBsAg plays a pivotal role in both screening and detecting HBV infection [11]. Mostly, HBV tests operate by identifying the presence of HBsAg in the blood plasma using its corresponding antibody (anti-HBs) kit. These commercial anti-HBs diagnostics are mainly manufactured through immunization processes in test animals using S antigens [12] derived either through recombinant technology or from infected plasma [13].

**Table 1.** Distribution of HBV genotypes and serotypes.

Genotypes	Sero-types	Geographic location
A	adw	Africa, India, Europe, North America
B	adw, ayw	China, Japan, Southeast Asia, Alaska, Canada, Greenland
C	adw, ayr, adr	Taiwan, China, Korea, Southeast Asia, Australia
D	ayw	Africa, Europe, Mediterranean countries, India, Indonesia
E	ayw	Restricted to West Africa

As reported by the NCTM, in 2021, out of 36 888 volunteer blood donors, 3.2% were rejected for transfusion due to transfusion-transmitted infections, with the majority being HBV positives [14]. Therefore, an HBV diagnostic test could be developed based on HBsAg antigen isolated from HBV-positive, rejected donor blood.

In our study, the S antigen of HBV was purified from the plasma of 83 first-time blood donors who tested positive for HBsAg, and its serotype was identified. The present work may serve as the initial step in our future endeavors to develop in-house diagnostic tools for detecting HBV infection in human blood plasma.

## Materials and methods

In this study, plasma from 83 blood donors, who were positive for HBV and negative for HCV, hepatitis A virus, human immunodeficiency virus, and syphilis by ELISA, were used.

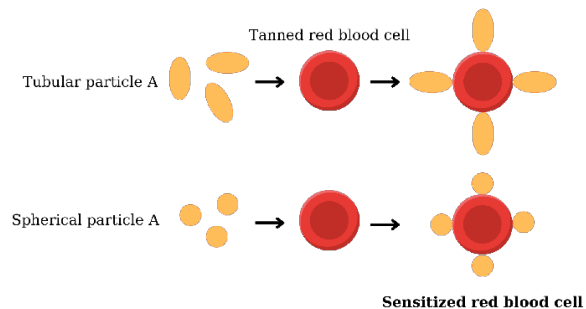
**Determination of HBsAg titer:** To determine antigen titers, all plasma samples were serially diluted, and a reverse passive hemagglutination (PHA) assay was performed with anti-HBs (Ht. 0.9%) sensitized red blood cells (RBCs). The antigen titer of each plasma sample was determined by the precipitation of red blood cells in test plates.

**Purification of HBsAg:** The selected blood plasma was subjected to precipitation using PEG6000. Hence, tubular and spherical particles of HBsAg were isolated by density gradient ultracentrifugation with KBr and 15%, 35%, 50% sucrose solutions, followed by purification through dialysis. Antigen purity was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a TSK gel G4000 column [15], and the concentration was measured at OD280 nm with a spectrophotometer. The identification of the antigen serotype was conducted

following the protocol of the Institute of Immunology of Japan [16].

**Determination of sensitivity, specificity, and stability of HBsAg:** To elucidate the characteristics of purified antigens, prototype models were assembled using red blood cells sensitized with 50 µg/ml and 100 µg/ml antigens of spherical and tubular particles, employing glutaraldehyde and tannic acid solutions (**Fig. 1**). Sensitivity and specificity analysis were conducted to determine antibody titers against the prototype models using the PHA assay. For specificity analysis, 10 anti-HBs positive and 10 negative samples were used to compare the prototype model with the standard antigen (product of the Institute of Immunology).

The stability of the antigens was assessed by determining their antibody-binding ability at 1 and 3 months after the assembly of the prototype models.



**Fig. 1.** Prototype model. Tanned red blood cell was sensitized with spherical and tubular HBsAg group A.

## Results

In order to obtain plasma containing a high antigen level through reverse PHA, blood plasmas were diluted by  $2^{14}$ ,  $2^{15}$ ,  $2^{16}$ , and  $2^{17}$  folds. Reverse PHA reactions occurred in 4 samples at  $2^{16}$  dilutions, and 6 samples at  $2^{15}$  dilutions. Based on their antigen titer, samples were divided into A and B groups (**Table 2**).

A total of 700 ml plasma from group A and 900 ml plasma from group B were concentrated to 140 ml and 180 ml respectively. Tubular and spherical particles of HBsAg were then purified through density gradient ultracentrifugation, resulting in 31.5 mg and 3.8 mg after concentrating plasma from group A and B, respectively. The antigen yield was determined, resulting in

**Table 2.** Identification of HBsAg yield and serotypes

Group	HBsAg titer	Antigen yield, mg/L	Serotype	
			Spherical	Tubular
A	$2^{16}$ or higher	45	ayw	ayr, ayw
B	$2^{15}$ - $2^{15.8}$	4	ayw	

yields of 45 mg/L for group A and 4 mg/L for group B, as presented in Table 2. In HPLC chromatograms, the first peaks (retention time of 11-13 min) and the third peaks (retention time of 13-17 min) indicate the aggregated HBsAg particles and multimeric HBsAg particles, respectively. The smaller peaks in the chromatogram (retention time of 27 min) represent the monomeric HBsAg particles (Fig. 2) [17]. Subsequently, HBsAg serotypes were identified in each group.

As a result, ayr and ayw serotypes were identified in tubular and spherical particles of group A, as well as both particles of group B (Table 2).

The sensitivity analysis of prototype models demonstrated that the antibody titer ranged between  $2^5$  and  $2^{5.3}$  in 50 µg/ml, whereas it remained at  $2^5$  in the 100 µg/ml prototype model with tubular A (Fig. 3).

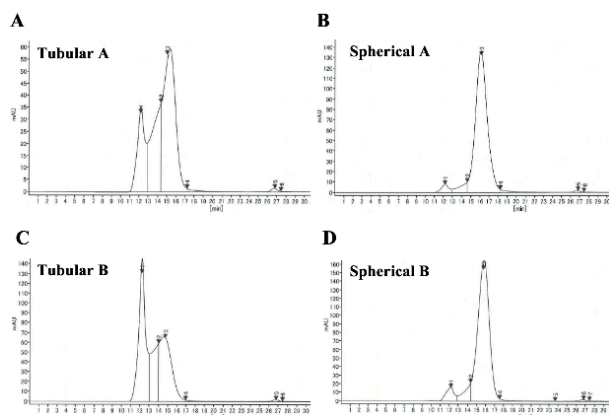


Fig. 2. HPLC chromatograms of the isolated HBsAg. A) Tubular HBsAg of group A. B) Spherical HBsAg of Group A C) Tubular HBsAg of Group B. D) Spherical HBsAg of Group B. Flow rate was 0.6 ml/min.

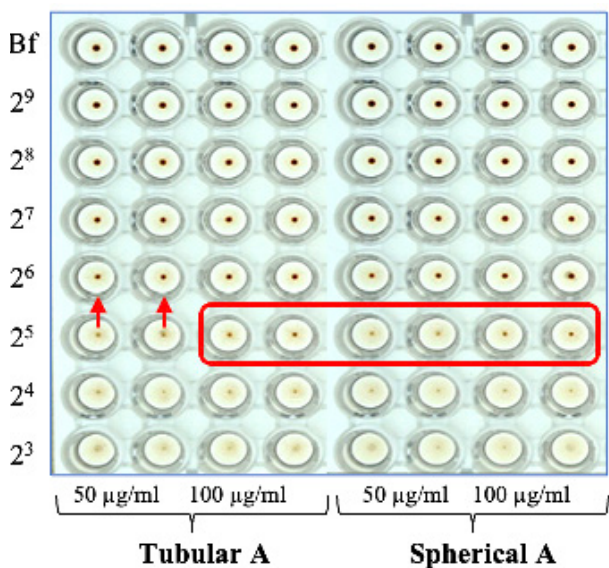


Fig. 3. Antibody titers against prototype model of HBsAg. Red arrows and boxes indicate antibody titer.

Moreover, a prototype model with spherical A showed the same antibody titer for each concentration (Table 3).

Table 3. Evaluation of the prototype model through antibody titer analysis.

Prototype model	Sensitized concentration		Value
	50 µg/ml	100 µg/ml	
Tubular A	$2^{5.3}$	$2^{5.0}$	Low
Spherical A	$2^{5.0}$	$2^{5.0}$	Low
Standard	$2^{6.3}$ or higher		

In the stability test for prototype models, no differences were observed in antibody titers against prototype models after 1 and 3 months (Fig. 4), indicating the stability of isolated HBsAg for at least 3 months.

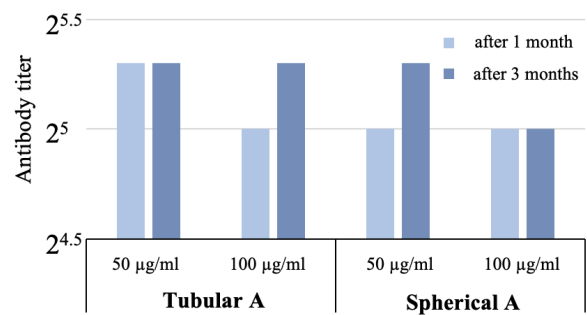
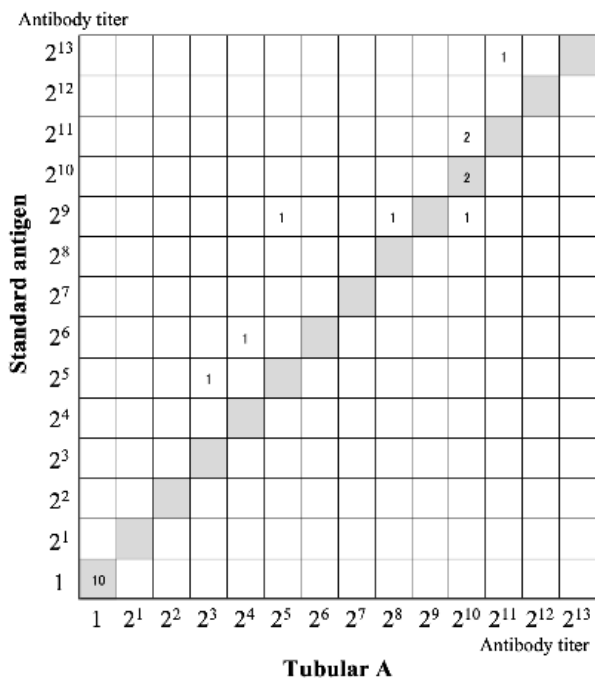


Fig. 4. Results of the stability analysis for prototype models of HBsAg were carried out after one and three months by determining antibody titers of assembling prototype models.

Furthermore, PHA analysis was performed to determine the specificity of the prototype model with tubular A compared to the standard antigen, using 10 anti-HBs positive and 10 negative samples. Among the anti-HBs positives, the average antibody titer against the prototype model with tubular A was  $2^{8.1}$ , while the average antibody titer against the standard antigen was  $2^{9.3}$ . A correlation diagram demonstrates the comparison of antibody titers of the standard antigen and the prototype model with tubular A in 10 anti-HBs positive samples (Fig. 5).

In the prototype model, one sample exhibited a higher antibody titer with tubular A compared to the standard antigen, while two samples demonstrated identical antibody titers in prototype models with tubular and standard antigens. Conversely, in 7 samples the standard antigen yielded a higher antibody titer compared to the prototype model with tubular A. For the 10 anti-HBs negative samples, no antibody titer was detected in either the prototype model with tubular A or the standard antigen.



**Fig. 5.** The specificity for prototype models of HBsAg was conducted by comparison with the standard antigen. Gray diagonals represent equal titers of antibody to standard antigen and prototype models with tubular A.

## Discussion

HBsAg is comparatively more abundant in infected individuals than other HBV antigens [18]. Therefore, in the present study, the blood plasma with a high HBsAg titer from HBV-positive individuals who wanted to be blood donors was used to isolate and characterize the S antigen. Our previous study indicated predicted correlations between virus genotype and liver cancer [19], with adw and adr serotypes being the most prevalent in HBsAg-positives [20]. In the present research, serotypes ayr and ayw were identified in samples with high HBsAg titers. Serotype ayr occurred widely in the HBV genotype C group [21]. It is estimated that 98.7% of HBV-infected Mongolian patterns belong to genotype D, while the remaining exhibit genotype A and recombinant genotype C/D [22], [19].

Finally, we assembled the prototype model with tubular particles, which remained stable for up to 3 months. However, its specificity and sensitivity were lower than standard antigens. This might be attributed to the presence of serotypes (ayr, ayw) that were not identified previously.

## Conclusion

In our study, both spherical and tubular particles of HBsAg were isolated from the blood plasma of 83

individuals who wanted to be blood donors. Following purification, their specificity, sensitivity, as well as stability were identified. Notably, for selected groups A and B with high antigen titer, there was an 11.25-fold difference in antigen yield, emphasizing the efficacy of using samples with the antigen detected at a  $2^{16}$  dilution.

The specificity and sensitivity of the isolated HBsAg were lower than the standard antigen, which might be attributed to differences in serotypes, despite its stability being satisfactory. Therefore, to re-establish the specificity and sensitivity of isolated HBsAg, a more detailed analysis of using specific antibodies against those serotypes within the Mongolian HBV-infected population may be necessary.

## References

- [1] H. Runggay *et al.*, "Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040," *J. Hepatol.*, vol. 77, no. 6, pp. 1598–1606, Dec. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.021>
- [2] O. Baatarkhuu, T. Gerelchimeg, D. Munkh-Orshikh, B. Batsukh, G. Sarangua, and J. Amarsanaa, "Epidemiology, Genotype Distribution, Prognosis, Control, and Management of Viral Hepatitis B, C, D, and Hepatocellular Carcinoma in Mongolia," *Euroasian J. Hepato-Gastroenterology*, vol. 8, no. 1, pp. 57–62, Jun. 2018, <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1260>.
- [3] *Chronic Hepatitis B (Handbook for clinician)*. Asian liver center at Stanford University School of Medicine, 2020.
- [4] S. Sabeena and N. Ravishankar, "Horizontal Modes of Transmission of Hepatitis B Virus (HBV): A Systematic Review and Meta-Analysis," *Iran. J. Public Health*, Oct. 2022, <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i10.10977>.
- [5] W. H. Organization, "Hepatitis B," 2023.
- [6] J. Pattyn, G. Hendrickx, A. Vorsters, and P. Van Damme, "Hepatitis B Vaccines," *J. Infect. Dis.*, vol. 224, no. Supplement\_4, pp. S343–S351, Sep. 2021, <https://doi.org/10.1093/infdis/jaa668>.
- [7] Paul A. Offit, K. M. Edwards, and S. A. Plotkin, *Plotkin's Vaccines*, 7th edition. Elsevier, 2017.
- [8] G. L. Le Bouvier, "Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus," *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 222, no. 8, pp. 928–930, Nov. 1972, <https://doi.org/10.1001/jama.222.8.928>.
- [9] C. L. Lin and J. H. Kao, "Hepatitis B Virus Genotypes and Variants," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, no. 5, pp. a021436–a021436, May 2015,

- <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>.
- [10] B. J. McMahon, "The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B," *Hepatol. Int.*, vol. 3, no. 2, pp. 334–342, Jun. 2009, <https://doi.org/10.1007/s12072-008-9112-z>.
- [11] S. Chevaliez, F. Roudot-Thoraval, C. Hézode, J.-M. Pawlotsky, and R. Njouom, "Performance of rapid diagnostic tests for hepatitis B surface antigen detection in serum or plasma," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 100, no. 2, p. 115353, Jun. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115353>.
- [12] M. C. Els, M. Govender, T. Marimuthu, M. O. Bubb, and J. D. Conradie, "Mouse Monoclonal Anti-HBs and Its Use in the Screening of Donated Blood by Elisa," *Vox Sang.*, vol. 46, no. 3, pp. 165–174, Mar. 1984, <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1984.tb00070.x>.
- [13] H. Momose *et al.*, "Performance evaluation of in vitro diagnostic kits for hepatitis B virus infection using the regional reference panel of Japan," *Viral J.*, vol. 20, no. 1, p. 93, May 2023, <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02054-7>.
- [14] B. Narantuya, "Health index report," Ulaanbaatar, 2021.
- [15] Y. Yang *et al.*, "Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens," *Vaccine*, vol. 33, no. 9, pp. 1143–1150, Feb. 2015, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.031>.
- [16] S. Usuda *et al.*, "A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies," *J. Immunol. Methods*, vol. 87, no. 2, pp. 203–210, Mar. 1986, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90532-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90532-6).
- [17] M. Yousefipour, M. Khatami, A. Javidanbardan, S. N. Hosseini, and M. Mehrnia, "Integration of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation for purification of recombinant hepatitis B surface antigen: An alternative method for immunoaffinity chromatography," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 49, no. 2, pp. 158–166, Feb. 2019, <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1550658>.
- [18] M. Krajden, G. McNabb, and M. Petric, "The Laboratory Diagnosis of Hepatitis B Virus," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 65–72, 2005, <https://doi.org/10.1155/2005/450574>.
- [19] Ts. Oyunsuren, "Molecular Genetics Features of HBV, HCV and HAV Spread Among the Mongolian Population," Ulaanbaatar: Sogoo nuur printing, 2011, pp. 28–29.
- [20] Y. Y. Kyaw *et al.*, "Distribution of hepatitis B virus genotypes in the general population of Myanmar via nationwide study," *BMC Infect. Dis.*, vol. 20, no. 1, p. 552, Dec. 2020, <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05269-z>.
- [21] A. Adel Dawood, "Hepatitis B Virus, Genotypes and Subtypes," in *Hepatitis B*, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100446>.
- [22] Ts. Oyunsuren, "Genotypes and mutations of HBV spread in Mongolia," *Mong. J. infected Dis. Res.*, vol. 4, no. 41, pp. 34–35, 2011.



## Хепатитийн В вирус (HBV)-ийн халдвартай хүний цуснаас HBsAg ялган, серотипийг тодорхойлсон дүн

Дамдинбазар Долгион<sup>1</sup> , Бямбажав Болортуяа<sup>1</sup> , Тошиаки Оцука<sup>2</sup> , Магвансүрэн Цэрэндэжид<sup>3</sup> ,  
 Намжил Эрдэнэбаяр<sup>3</sup> , Цэндсүрэн Оюунсүрэн<sup>1</sup> , Даваахүү Гантулга<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Монгол Улс, Улаанбаатар, Шинжлэх ухааны академи, Биологийн хүрээлэн, Молекул биологийн лаборатори

<sup>2</sup>Япон Улс, Точиги, Иммунологийн хүрээлэн

<sup>3</sup>Монгол Улс, Улаанбаатар, Цус сэлбэлт судлалын үндэсний төв

\*Холбоо барих зохиогч: gantulgad@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0003-3792-7101>

**Хураангуй.** Монгол улсын хүн амын дундах хепатитийн вирусийн халдвар болон вирусийн шалтгаант элэгний өвчлөлийн тохиолдол дэлхийд тэргүүлэх байранд байдаг. Олон улсад хепатитийн В вирус (HBV)-ийн оношилгоо болон дархлаажуулалтын судалгаанд гадаргуугийн эсрэгтөрөгч (HBsAg)-ийг өргөнөөр ашигладаг. Бид манай Цус сэлбэлт судлалын үндэсний төв (ЦССҮТ)-д цуглуулсан HBV-ийн халдвартай 83 донорын цусны ийлдэс дэх HBsAg-ийн илэрцийг тогтоон, эсрэгтөрөгчийн илэрц өндөр 10 дээжийг А болон Б бүлэгт ангилан HBsAg-ийг ялгаж, тус бүрд ауг болон ауw серотипүүдийг тодорхойлсон. Улмаар эсрэгтөрөгчийн агууламж өндөр А бүлгээс ялган авсан бөмбөлөг ба утаслаг эсрэгтөрөгчийг ашиглан прототип загварыг гарган авч шинж чанарыг тодорхойлоход тэдгээрийн тогтвортой байдал сайн хэдий ч мэдрэг болон өвөрмөц чанар нь стандарт эсрэгтөрөгчтэй харьцуулахад сул болохыг тогтоов. Энэ нь бидний судалгаагаар ауг болон ауw серотип бүхий эсрэгтөрөгч илэрсэнтэй хамааралтай байх боломжтой.

**Түлхүүр үгс:** серотип, эсрэгбиеийн таньц, прототип загвар

Хүлээн авсан 2023.10.05; хянан тохиолдуулсан 2023.10.28; зөвшөөрсөн 2023.11.15

© 2023 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### Оршил

Манай улс хепатит вирусийн тархалтаар өндөрт тооцогддог бөгөөд 2020 оны байдлаар 100 000 хүн тутамд элэгний хорт хавдрын 86.5 өвчлөлийн шинэ тохиолдол бүртгэгдэж уг үзүүлэлтээр дэлхийд тэргүүлж байна [1]. Үүний дийлэнх хувийг хепатитийн В вирус (HBV) (34%), хепатитийн С вирус (HCV) (46%) болон хавсарсан халдвар (14%) бүхий тохиолдлууд эзэлж байна [2]. HBV нь хүнд архаг (ург хугацааны) болон цочмог (богино хугацааны, ноцтой) халдвар үүсгэдэг вирус [3] бөгөөд ихэвчлэн цус, биеийн шингэн, халдвартай зүү тариур, бэлгийн замаар дамжин халдварлахаас гадна эхээс урагт жирэмсний хугацаанд эсвэл төрөх явцад халдварлах боломжтой [4]. HBV-ийн халдвар авсан зарим хүмүүст шинж тэмдэг илэрдэггүйгээс гадна цаашид элэгний хатуурал болон дутагдалд орох, улмаар элэгний хавдар зэрэг ноцтой өвчлөлтүүд бий болдог тул дэлхий даяар эрүүл мэндийн томоохон асуудал хэмээн авч үздэг [5]. HBV нь Hepadnaviridae

овогт хамаарагдах ДНХ бүхий вирус [6] бөгөөд гадаргуугийн (HBsAg), цөмийн (HBcAg), e (HBеAg) эсрэгтөрөгч нийлэгжүүлдэг [7]. HBV-ийг түүний эсрэгтөрөгчийн эпителиудад үндэслэн дөрвөн серотипэд (adw, adr, ауw, ауг) хуваадаг [8] ба геномын дарааллын хувьд хамгийн багадаа 8%-ийн ялгаатай 10 үндсэн генотипийг (А-Ј) тодорхойлоод байна [9]. Эдгээр генотип болон серотипуудын тархалт нь газарзүйн байрлалтай хамааралтай байдгаас гадна [9] (**1-р хүснэгт**) архаг HBV-ийн халдварын үр нөлөөг урьдчилан таамаглах хүчин зүйл болдог [10].

HBV-ийн эсрэгтөрөгчүүдээс HBsAg нь HBV-ийн халдварыг илрүүлэх гол маркер уураг болон оношилгоонд ашиглагддаг [11]. HBV-ийн ихэнх оношлуур нь цусан дахь эсрэгтөрөгчийг түүний эсрэг эсрэгбие (anti-HBs)-д таниулах замаар ажилладаг бөгөөд anti-HBs-ийг туршилтын амьтныг дархлаажуулах замаар гарган авдаг [12]. Үүнд рекомбинант эсрэгтөрөгч болон HBV-ийн халдвар бүхий ийлдэснээс ялгасан HBsAg-ийг ашигладаг [13].

**1-р хүснэгт.** HBV-ийн генотип болон серотип, тэдгээрийн тархалт

Генотип	Серотип	Газарзүйн байрлал
A	adw	Африк, Энэтхэг, Европ, Өмнөд Америк
B	adw, ayw	Хятад, Япон, Зүүн Өмнөд Ази, Аляска, Канада, Гренланд
C	adw, ayr, adr	Тайван, Хятад, Солонгос, Зүүн Өмнөд Ази, Австрали
D	ayw	Африк, Европ, Газар дундын тэнгис, Энэтхэг, Индонез
E	ayw	Баруун африк
F	adw	Төв болон Өмнөд Америк

Манай ЦССҮТ болон түүний салбаруудад цусаа өгсөн доноруудын сорьцод цус сэлбэлтээр дамжих 4 төрлийн вирусийн халдварыг илрүүлэх шинжилгээг бүрэн хийдэг бөгөөд 2021 онд нийт шинжилсэн 36 888 донороос 3.2% нь уг вирусүүдийн халдвартайн улмаас хасагдсанаас ихэнх нь HBV-ийн халдвартай байсан нь тогтоогджээ [14]. Иймээс уг хасагдаж буй донорын цуснаас эсрэгтөрөгчийг ялган авч HBV-ийн халдварыг илрүүлэх оношлуурыг гарган авах боломжтой хэмээн үзсэн нь судалгааны үндэслэл болно.

Энэхүү судалгаагаар бид HBV-ийн халдвартай болох нь тогтоогдсон 83 цусны ийлдэснээс HBsAg-ийг ялган цэвэршүүлж, түүний серотип болон бусад шинж чанаруудыг тодорхойлох зорилт тавин ажиллав. Энэ нь цаашид туршилтын амьтныг дархлаажуулан холбогдох эсрэгбие ялган авч Монгол хүнд тохирсон HBV-ийн халдварыг илрүүлэх оношлуур боловсруулах судалгааны ажлын үндэслэл болох юм.

**Судалгааны материал, арга зүй**

ЦССҮТ-ийн лабораторид фермент холбоот эсрэгбиеийн урвалын (ELISA) аргаар HBV эерэг, HCV, гепатитийн А вирус, хүний дархлал хомсдолын вирус, тэмбүү сөрөг болох нь тогтоогдсон нийт 83 донорын цусны ийлдсийг энэхүү судалгаанд ашиглав.

*HBsAg-ийн илэрц тогтоох:* Цусны ийлдсийг 214, 215, 216, 217 дахин шингэрүүлэн цус наалдахыг саатуулах урвал (ЦНСУ)-ын шинжилгээгээр эсрэгтөрөгчийн илэрцийг тодорхойлов. Дээжид агуулагдах эсрэгтөрөгч улаан эстэй холбогдож байвал туршилтын хавтангийн ёроолд улаан эсийн тунадас үүсэхгүй. Үүнд үндэслэн шингэрүүлсэн ийлдэс бүрд эсрэгтөрөгч агуулагдаж байгаа эсэхийг тогтоов.

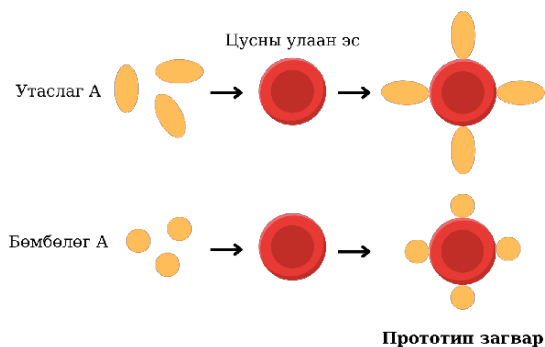
*HBsAg-ийг ялгах:* Эсрэгтөрөгчийн илэрц өндөр

цусны ийлдсийг ПЭГ6000 ашиглан тунадасжуулав. Улмаар KBr болон 15%, 35%, 50%-ийн сахарозын уусмалууд ашиглан нягтын градиентийн ультрацентрифугийн тусламжтайгаар бөмбөлөг (ойролцоогоор 22 нм) ба утаслаг (50-230 нм: 22 нм) хэлбэр бүхий HBsAg-ийг ялгаж, диализын аргаар цэвэршүүлэн авав. Ялган авсан эсрэгтөрөгчийн цэвэршилтийг TSK гель G4000 багана ашиглан өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографи (HPLC)-ийн аргаар шалгаж [15], концентрацыг спектрофотометрийн аргаар тодорхойлов. Харин эсрэгтөрөгчийн серотипийг Япон улсын Иммунологийн хүрээлэнгийн арга зүйн дагуу тодорхойлов [16].

*HBsAg-ийн мэдрэг, өвөрмөц чанар, тогтвортой байдлыг тодорхойлох:* Глутералдегид болон таннийн хүчлийн уусмалын тусламжтайгаар бөмбөлөг болон утаслаг эсрэгтөрөгчүүдийг 50 мкг/мл, 100 мкг/мл концентрацтайгаар улаан эсэд холбож прототип загвар гарган авсан (**1-р зураг**) ба түүний мэдрэг чанарыг ЦНСУ-ын аргаар прототип загварт холбогдох эсрэгбиеийн таньцыг тогтоож шалгасан. Өвөрмөц чанарыг HBV-ийн эсрэгбие эерэг болон сөрөг тус бүр арван дээжид стандарт эсрэгтөрөгчтэй харьцуулан тодорхойлсон. Харин эсрэгтөрөгчийг холбон прототип загвар гарган авснаас хойш 1 болон 3 сарын дараа ЦНСУ-ын шинжилгээ хийж тогтвортой байдлыг шалгав.

**Судалгааны үр дүн**

HBV-ийн халдвартай 83 донорын цусны ийлдсийг



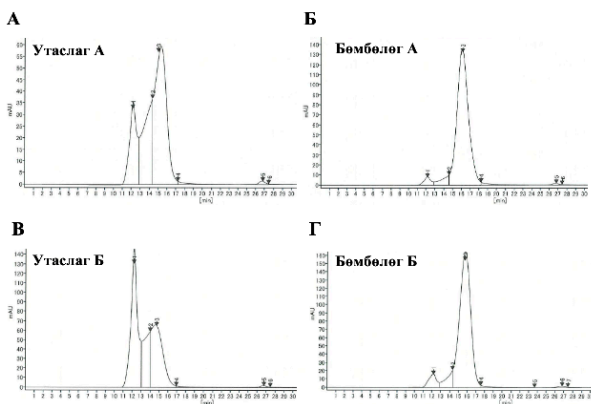
**1-р зураг.** Прототип загвар. А бүлгийн утаслаг болон бөмбөлөг хэлбэрийн эсрэгтөрөгчийг улаан эсэд холбосон прототип загвар.

214-217 дахин шингэрүүлэн HBsAg-ийн илэрцийг ЦНСУ-ын шинжилгээний аргаар шалгахад 216 дахин шингэрүүлсэн 4 ийлдсэнд, 215 дахин шингэрүүлсэн 6 ийлдсэнд дээрх эсрэгтөрөгч илэрсэн.

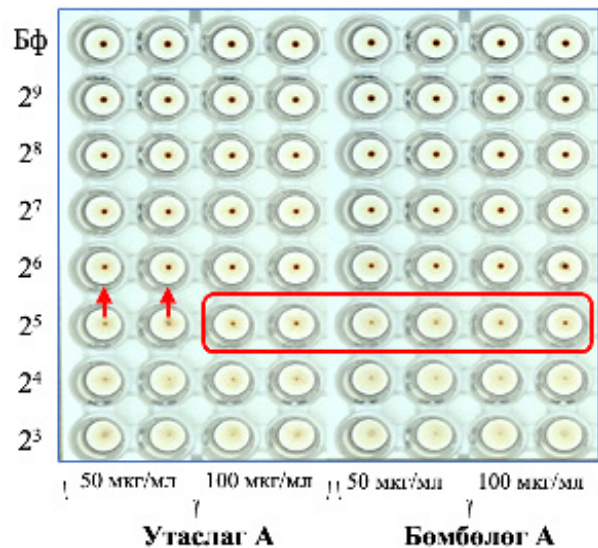
Улмаар тус дээжүүдийг эсрэгтөрөгчийн

агууламжаар нь А, Б бүлэг болгон ангилан А бүлгийн 700 мл ийлдсийг өтгөрүүлж 140 мл, Б бүлгийн 900 мл ийлдсийг 180 мл болгон өтгөрүүлэв. HBsAg-ийг нягтын градиентийн дагуу цэвэршүүлэн бөмбөлөг болон утаслаг хэлбэр бүхий 31.5 мг болон 3.8 мг уургийг А, Б бүлгүүдээс тус тус ялгав. Үүнийг судалгаанд авсан ийлдэсний хэмжээтэй харьцуулан эсрэгтөрөгчийн гарцыг тооцоолоход А бүлгийн хувьд **2-р хүснэгт**. HBsAg ялган, серотипийг тодорхойлсон дүн.

Бүлэг	HBsAg-ийн илэрц	Эсрэгтөрөгчийн гарц, мг/л	Серотип	
			Бөмбөлөг	Утаслаг
А	2 <sup>16</sup> ба түүнээс дээш	45	ayw	ayw, ayw
Б	2 <sup>15</sup> -2 <sup>15.8</sup>	4	ayw	



**2-р зураг.** Ялган авсан HBsAg-ийн цэвэршилтийг шалгасан дүн. А) А бүлгийн утаслаг HBsAg. Б) А бүлгийн бөмбөлөг HBsAg. В) Б бүлгийн утаслаг HBsAg. Г) Б бүлгийн бөмбөлөг HBsAg. Урсгалын хурд 0.6 мл/мин.



**3-р зураг.** HBsAg-ийн прототип загваруудад эсрэгбиений таньц тогтоосон үр дүнг зургаар харуулав (хэвтээ тэнхлэгт прототип загварын концентрац, босоо тэнхлэгт эсрэгбиений шингэрүүлэлт). Улаан сум болон тэмдэглэгээгээр эсрэгбиений таньцыг тэмдэглэв.

45 мг/л, Б бүлэгт 4 мг/л гарцтай байв. Судалгааны дүнд А бүлгийн утаслаг хэлбэрт ауг болон ауw серотип, А бүлгийн бөмбөлөг хэлбэр болон Б бүлэгт ауw серотип тодорхойлогдсон (**2-р хүснэгт**).

Мөн утаслаг болон бөмбөлөг эсрэгтөрөгчийн цэвэршилтийг HPLC-ийн аргаар шалгахад мультимер (пик 3), мономер (пик 5), агрегацлагдсан (пик 1) HBsAg-ийн хэлбэрүүд [17] цэвэршилт өндөртэйгөөр ялгагдсан нь тогтоогдов (**2-р зураг**).

Эсрэгтөрөгчийн гарц өндөр А бүлгийг сонгон авч 50 болон 100 мкг/мл концентрацтайгаар прототип загварыг угсран мэдрэг чанарыг шалгав.

50 мкг/мл болон 100 мкг/мл концентрацтай утаслаг А прототип загваруудад холбогдох стандарт эсрэгбиений таньц тус тус 2<sup>5.3</sup>, 2<sup>5</sup> байсан бол бөмбөлөг А эсрэгтөрөгчийн ялгаатай концентрац бүхий прототип загваруудад стандарт эсрэгбиений таньц ижил байв (**3-р хүснэгт**).

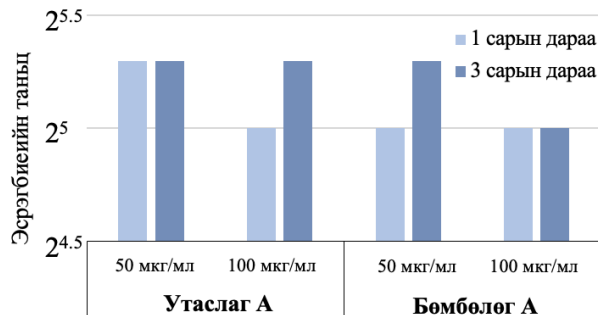
Мөн 3-р хүснэгтээс харахад прототип загварын мэдрэг чанар нь стандарт эсрэгтөрөгчтэй харьцуулахад сул байв. Үүний дараа прототип загвар гарган авснаас нэг болон гурван сарын дараа

**3-р хүснэгт.** Эсрэгбиений таньцыг стандарт хэмжээтэй харьцуулсан үнэлгээ.

Прототип загвар	HBsAg-ийн концентрац		Үнэлгээ
	50 мкг/мл	100 мкг/мл	
Утаслаг А	2 <sup>5.3</sup>	2 <sup>5.0</sup>	Бага
Бөмбөлөг А	2 <sup>5.0</sup>	2 <sup>5.0</sup>	Бага
Стандарт хэмжээ	2 <sup>6.3</sup> болон түүнээс дээш		

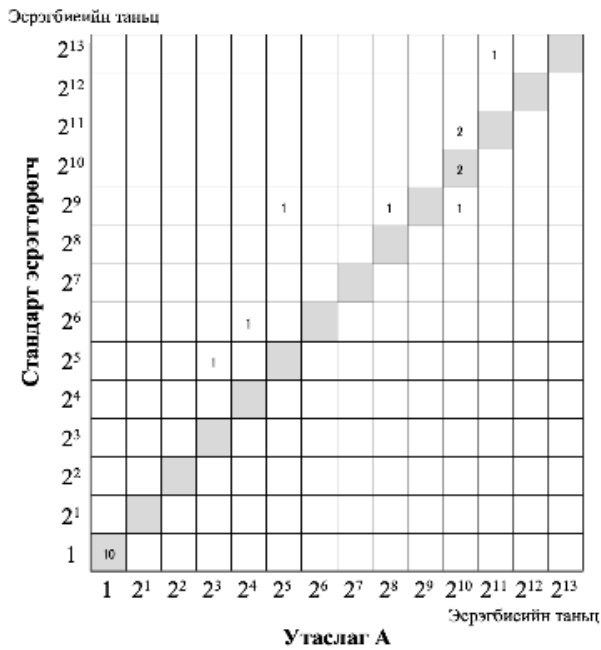
HBsAg-ийн тогтвортой байдлыг шалгахад утаслаг ба бөмбөлөг эсрэгтөрөгчийн эсрэгбиетэй холбогдох чадвар өөрчлөгдөөгүй хэвээр байв (**4-р зураг**).

Тиймээс HBV эсрэгбие эерэг 10, болон сөрөг 10 дээжид ЦНСУ-ын шинжилгээг хийж утаслаг А эсрэгтөрөгчийн өвөрмөц чанарыг Японы Иммунологийн хүрээлэнд ашиглагдаж байсан стандарт эсрэгтөрөгчтэй харьцуулан тогтоосон.



**4-р зураг.** HBsAg-ийн прототип загваруудын тогтвортой байдлыг улаан эсэд холбосноос хойш нэг болон гурван сарын дараа ЦНСУ-ын туршилтаар шалгасан дүн.





**5-р зураг.** HBsAg-ийн прототип загваруудын өвөрмөц чанарыг стандарт эсрэгтөрөгчтэй харьцуулан шалгасан дүн. Саарал өнгийн диагональ нь стандарт болон утаслаг А эсрэгтөрөгчид холбогдох эсрэгбиеийн таньцын ижил хэмжээг илэрхийлнэ.

Бидний ялгасан утаслаг А HBsAg-д холбогдох эсрэгбие эерэг 10 дээжийн дундаж таньц  $2^{8.1}$  байсан бол стандарт эсрэгтөрөгчид холбогдох дундаж таньц  $2^{9.3}$  байв. Утаслаг эсрэгтөрөгч А болон стандарт эсрэгтөрөгчид холбогдох эсрэгбиеийн таньцыг харьцуулсан корреляцийн диаграммыг 5-р зурагт харуулав. Эсрэгбие сөрөг 10, эсрэгбие эерэг 2 дээжид утаслаг А эсрэгтөрөгч нь стандарт эсрэгтөрөгчтэй ижил үр дүн үзүүлсэн. Эсрэгбие эерэг 7 дээжийн стандарт эсрэгтөрөгчтэй холбогдох эсрэгбиеийн таньцын хэмжээ бидний ялгасан эсрэгтөрөгчөөс өндөр байсан, харин 1 дээжид утаслаг А эсрэгтөрөгчтэй холбогдох эсрэгбиеийн таньцын хэмжээ өндөр байв.

### Хэлэлцүүлэг

Хүний цусанд HBsAg нь HBV-ийн бусад эсрэгтөрөгчтэй харьцуулахад их хэмжээгээр илэрдэг [18]. Гиймээс бид HBV эерэг донорын цуснаас HBsAg-ийн илэрц өндөртэй дээжийг сонгон эсрэгтөрөгчийг ялган түүний шинж чанарыг тодорхойлов. Молекул биологи ба иммунологийн судалгааны дүнд HBsAg-ийн генотип ба серотипүүдийн хооронд харилцан хамаарал байдгийг тогтоосон [19] бөгөөд HBsAg эерэг хүмүүсийн дунд adw болон adr серотип хамгийн өргөн тархсан байдаг [20]. Харин бидний

судалгааны дүнд HBsAg ауг болон ауw серотипүүд тодорхойлогдсон. Серотип ауг нь С генотипэд өргөн тохиолддог бол ауw нь С генотипээс бусад бүх генотипэд тохиолддог [21]. Монгол хүний популяцид халдварлан тархсан HBV-ийн генетик хэв шинжийн судалгааны дүнд 98.7% нь генотип D, бусад нь А эсвэл C/D хоршил бүхий генотипэд хамаарагдахыг тогтоожээ [19], [22].

Бидний ялган авсан эсрэгтөрөгчийн тогтвортой байдал сайн хэдий ч тэдгээрийн өвөрмөц болон мэдрэг чанар харьцангуй сул байна. Энэ нь бүс нутгийн ялгаатай байдалтай холбоотойгоор өмнө нь тодорхойлогдож байгаагүй серотипүүд (ауг, ауw) илэрсэнтэй холбоотой байх магадлалтай юм.

### Дүгнэлт

Донорын цусны ийлдэснээс эсрэгтөрөгчийн илэрц өндөртэй дээжүүдийг сонгон авч бөмбөлөг ба утаслаг хэлбэрийн эсрэгтөрөгчийг ялган цэвэршүүлж, тэдгээрийн өвөрмөц, мэдрэг чанар болон тогтвортой байдлыг тодорхойлов. Сонгон авсан бүлгүүдийн HBsAg-ийн гарц ихээхэн ялгаатай байсан тул цаашид  $2^{16}$  дахин шингэрүүлсэн ийлдсэнд эсрэгтөрөгч илэрсэн дээжийг ашиглах нь үр дүнтэй гэж үзэв.

HBsAg-ийн өвөрмөц болон мэдрэг чанар нь харьцуулан авч үзсэн эсрэгтөрөгчийнхөөс бага байсан нь серотипийн ялгаатай байдлаас шалтгаалсан байх магадлалтай. Гэвч бидний ялган авсан HBsAg нь цэвэршилт өндөр, тогтвортой байдал сайн байсан тул Монгол хүнд тархсан HBV-ийн эсрэг өвөрмөц эсрэгбиеийг ашиглан ялган авсан эсрэгтөрөгчийн мэдрэг болон өвөрмөц шинж чанарыг дахин тогтоох судалгааг үргэлжлүүлэх шаардлагатай.

### Ашигласан бүтээл

- [1] H. Rumgay *et al.*, “Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040,” *J. Hepatol.*, vol. 77, no. 6, pp. 1598–1606, Dec. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.021>
- [2] O. Baatarkhuu, T. Gerelchimeg, D. Munkh-Orshikh, B. Batsukh, G. Sarangua, and J. Amarsanaa, “Epidemiology, Genotype Distribution, Prognosis, Control, and Management of Viral Hepatitis B, C, D, and Hepatocellular Carcinoma in Mongolia,” *Euroasian J. Hepato-Gastroenterology*, vol. 8, no. 1, pp. 57–62, Jun. 2018, <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1260>.
- [3] Chronic Hepatitis B (Handbook for clinician). Asian liver center at Stanford University School of

- Medicine, 2020.
- [4] S. Sabeena and N. Ravishankar, “Horizontal Modes of Transmission of Hepatitis B Virus (HBV): A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Iran. J. Public Health*, Oct. 2022, <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i10.10977>.
- [5] W. H. Organization, “Hepatitis B,” 2023.
- [6] J. Pattyn, G. Hendrickx, A. Vorsters, and P. Van Damme, “Hepatitis B Vaccines,” *J. Infect. Dis.*, vol. 224, no. Supplement\_4, pp. S343–S351, Sep. 2021, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa668>.
- [7] Paul A. Offit, K. M. Edwards, and S. A. Plotkin, *Plotkin’s Vaccines*, 7th edition. Elsevier, 2017.
- [8] G. L. Le Bouvier, “Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 222, no. 8, pp. 928–930, Nov. 1972, <https://doi.org/10.1001/jama.222.8.928>.
- [9] C. L. Lin and J. H. Kao, “Hepatitis B Virus Genotypes and Variants,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, no. 5, pp. a021436–a021436, May 2015, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>.
- [10] B. J. McMahon, “The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B,” *Hepatol. Int.*, vol. 3, no. 2, pp. 334–342, Jun. 2009, <https://doi.org/10.1007/s12072-008-9112-z>.
- [11] S. Chevaliez, F. Roudot-Thoraval, C. Hézode, J.-M. Pawlotsky, and R. Njouom, “Performance of rapid diagnostic tests for hepatitis B surface antigen detection in serum or plasma,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 100, no. 2, p. 115353, Jun. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115353>.
- [12] M. C. Els, M. Govender, T. Marimuthu, M. O. Bubb, and J. D. Conradie, “Mouse Monoclonal Anti-HBs and Its Use in the Screening of Donated Blood by Elisa,” *Vox Sang.*, vol. 46, no. 3, pp. 165–174, Mar. 1984, <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1984.tb00070.x>.
- [13] H. Momose *et al.*, “Performance evaluation of in vitro diagnostic kits for hepatitis B virus infection using the regional reference panel of Japan,” *Virol. J.*, vol. 20, no. 1, p. 93, May 2023, <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02054-7>.
- [14] B. Narantuya, “Health index report,” Ulaanbaatar, 2021.
- [15] Y. Yang *et al.*, “Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens,” *Vaccine*, vol. 33, no. 9, pp. 1143–1150, Feb. 2015, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.031>.
- [16] S. Usuda *et al.*, “A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies,” *J. Immunol. Methods*, vol. 87, no. 2, pp. 203–210, Mar. 1986, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90532-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90532-6).
- [17] M. Yousefipour, M. Khatami, A. Javidanbardan, S. N. Hosseini, and M. Mehrnia, “Integration of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation for purification of recombinant hepatitis B surface antigen: An alternative method for immunoaffinity chromatography,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 49, no. 2, pp. 158–166, Feb. 2019, <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1550658>.
- [18] M. Kraiden, G. McNabb, and M. Petric, “The Laboratory Diagnosis of Hepatitis B Virus,” *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 65–72, 2005, <https://doi.org/10.1155/2005/450574>.
- [19] Ts. Oyunsuren, “Molecular Genetics Features of HBV, HCV and HAV Spread Among the Mongolian Population,” Ulaanbaatar: Sogoo nuur printing, 2011, pp. 28–29.
- [20] Y. Y. Kyaw *et al.*, “Distribution of hepatitis B virus genotypes in the general population of Myanmar via nationwide study,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 20, no. 1, p. 552, Dec. 2020, <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05269-z>.
- [21] A. Adel Dawood, “Hepatitis B Virus, Genotypes and Subtypes,” in *Hepatitis B*, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100446>.
- [22] Ts. Oyunsuren, “Genotypes and mutations of HBV spread in Mongolia,” *Mong. J. infected Dis. Res.*, vol. 4, no. 41, pp. 34–35, 2011.