

Raport științific etapa 1 – mai-decembrie 2020

Virusul Hepatitelor C (VHC) și B (VHB) constituie o problemă de sănătate globală, deoarece sunt peste 330 de milioane de persoane infectate în lumea întreagă. La nivel global, cca. 15 milioane de pacienți infectați cu VHB sunt co-infectați cu virusul hepatic D (VHD), un viroid care necesită virusul hepatic B pentru producția particulelor infecțioase. Coinfecția VHB/VHD induce cea mai gravă formă de hepatită din cauza replicării accelerate a VHD. Testele de tip EIA (test imunoenzimatic) reprezintă standardul în screeningul pentru detecția anticorpilor anti-VHC a antigenului HBSAg. Un rezultat pozitiv conduce la determinarea concentrației de copii genomice ale VHC/B în ser care confirmă infecția activă. Testele EIA necesită dotări speciale ale laboratorului de analize, colectarea organizată a probelor și calificarea personalului din laborator. În țări cu venit scăzut unde există regiuni fără laboratoare medicale sau personal calificat, o alternativă la testele EIA o reprezintă testele cu detecție rapidă (RDT) (Drain et al., 2014). Majoritatea testelor RDT se bazează pe principiul imunocromatografiei și tehnologiei Lateral Flow Assay (LFA) - testul de curgere laterală, deoarece proba avansează prin curgere capilară. Parametrii testelor actuale sunt satisfăcători în condiții de monoinfecție cu VHC sau VHB (Mane et al., 2019). Dacă în cazul VHB există teste rapide eficiente pentru detecția antigenului viral de anvelopă S (AgHBs), în cazul VHD nu există teste rapide validate pentru detecția anticorpilor anti-VHD. La nivel național se estimează că sunt mai mult de 1 milion de persoane infectate cu VHB, peste 400.000 persoane infectate cu VHC și peste 100.000 persoane infectate VHB/VHD (Predescu et al, 2017, Popescu et al., 2013). Identificarea acestora prin screening cu teste rapide ar putea permite accesul timpuriu la tratament în cazul VHC și VHB. Semnalarea unei posibile coinfecții VHB/VHD ar direcționa gestionarea rapidă a pacienților având în vedere gravitatea prognosticului patologiei hepatice. Obiectivul proiectului este asamblarea și introducerea pe piață a unui test de diagnostic rapid multiplex pentru detecția simultană a antigenului de suprafață al VHB (AgHBs), anticorpilor anti-VHC și anti-VHD (VHC/VHB/VHD).

Rezultate

Clonarea și expresia antigenelor VHD (Activitatea 1.1)

Proiectarea și obținerea vectorilor de expresie procariote a antigenelor VHD

Virusul Hepatitei D are o diversitate genetica cu sapte genotipuri. Pentru a alege secventele antigenelor virale cu reprezentativitate maxima s-a elaborat o strategie in doua etape: obtinerea unei secvente teoretice globale care sa reprezinte o multime cat mai mare de secvente si intrapolarea acestei secvente teoretice in setul care cuprinde genotipul 1 (cel mai prevalent in Romania) in vederea extragerii secventei cu probabilitatea de reprezentativitate maxima.

Expresia si purificarea antigenelor VHD in sistem procariot

Pentru inceput s-a realizat expresia antigenelor VHD in sistem de expresie procariot. Din cele trei antigene s-au exprimat cu succes fragmentele 60-140 si 1-214 (Figura 1A). In continuare s-a determinat solubilitatea celor doua fragmente proteice. In timp ce proteina 1-214 este absenta din fractia solubila, fragmentul 60-140 este total solubil dupa cum se vede in Figura 1B. Antigenul 60-140 a fost purificat din extractul solubil pe coloane de Ni-NTA (Figura 1C).

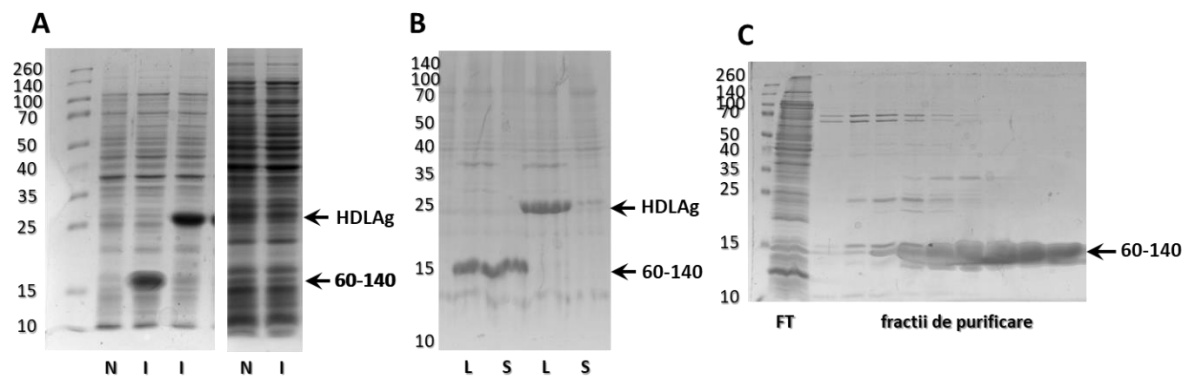


Figura 1 Expresia si purificarea antigenelor VHD in sistem procariot. A. Lizatele totale ale peletilor celulari care exprima (I) sau nu (N) antigenele 60-140 si 1-214; B. Fractia solubila (S) si lizatul total (L) al peletilor celulari care exprima antigenele 60-140 si 1-214 C. Fractii de elutie ale antigenului 60-140 si fractia care nu a interactionat cu coloana (FT) (Mw – marker molecular Broad Range -BioRad)

Obținerea antigenelor VHC (Activitatea 1.3)

Producție de antigene virale HCV în formă pură în vederea testărilor ulterioare de specificitate și senzitivitate

Antigenul VHD NS3 a fost exprimat in sistem procariot uramand sa fie purificat prin cromatografie de afinitate in sistem Ni-NTA (Figura 2A). Purificarea proteinelor core90 si

core120 s-a realizat din extractul insolubil, prin spalarea corpurilor de incluziune, solubilizare si separare prin cromatografie de schimb ionic (Figura2B).

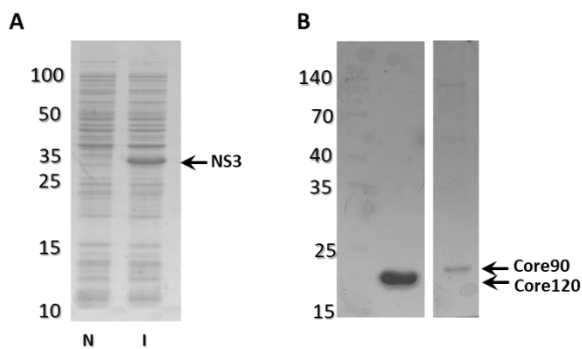


Figura 2 Expresia si purificarea antigenelor VHC in sistem procariot. Antigene virale au fost exprimate si purificate in sistem procariot dupa cum s-a descris in sectiunea Materiale si Metode. Puritatea lor a fost evaluata prin SDS-PAGE si colorare a gelului. A. Antigenul NS3 in lizat celular indus (I) sau neindus (N) cu IPTG; B. Core90 din elutiile cu NaCl 1M si, respectiv 1.5M si Core120 (Mw – marker molecular Broad Range -BioRad)

Asamblare de teste Elisa pentru fiecare antigen în parte, optimizare protocol de asamblare

În vederea verificării imunogenității antigenelor *C120 E3*, *His core 90*, respectiv *C HBD Ag* am dezvoltat și optimizat o metodă imunoenzimatică ELISA.

Hepatitis Delta Virus ELISA:

Microplaca ELISA a fost preactivată cu Coating Buffer. După pre-activare se aspiră complet conținutul godeurilor. Pentru acoperirea godeurilor am folosit trei antigene diferite: *C120 E3* într-o concentrație de 5 μg/ml în Coating Buffer, *His core 90* într-o concentrație de 5 μg/ml în Coating Buffer și *C HBD Ag* într-o concentrație de 20 μg/ml în Coating Buffer, cu fiecare acoperind câte 4 strip-uri. Am adăugat câte 100 μl soluție antigen în fiecare din godeurile respective, incubarea a fost peste noapte la 4°C. După incubare, conținutul godeurilor a fost complet aspirată și godeurile au fost blocate cu Soluție Tampon de Blocare. După incubare, conținutul godeurilor a fost complet aspirată.

Pentru diluarea probelor se adaugă 1 μl ser uman la 100 μl diluant de probă, se amestecă prin vortexare.

Se adaugă câte 100 µl din probele diluate în godeurile respective. Se incubează la temperatura camerei timp de 1 oră în întuneric. Se spală fiecare godeu de 5 ori cu 350 µl Soluție Tampon de Spălare. După spălare se aspiră complet conținutul godeurilor.

Se adaugă 100 µl anti-human IgG conjugat cu enzima HRP în fiecare godeu și se incubează la temperatura camerei timp de 15 minute în întuneric. Se spală fiecare godeu de 5 ori cu 350 µl Soluția Tampon de Spălare. Se adaugă 100 µl Soluție de Substrat TMB în fiecare godeu și se incubează la temperatura camerei timp de 20 de minute în întuneric. Se adaugă 50 µl Soluție Stop în fiecare godeu și se citesc valorile densității optice (OD) la 450 și 620 nm la un cititor de stripuri Statfax.

În cazul microplăcii care conține antigenul C120 E3, am obținut semnal bun pentru probele pozitive, iar pentru probe negative am obținut semnal de fundal scăzut ($OD < 0,61$). Comparativ cu kitul comercial însă, intensitatea acestui semnal este mai mică, dar acesta se poate îmbunătăți prin combinarea a diferitelor antigene virale pe placă. În cazul plăcii care conține His core 90 însă, absorbantele au fost scăzute, probabil s-a deteriorat proteina în timpul transportului sau trebuie optimizată concentrația pe microplacă.

OD-uri obținute cu metoda optimizată ELISA, comparativ cu un kit comercial:

Ser deidentificat	Kit comercial HCV Ab	Microplacă cu C120 E3	Microplacă cu His core 90
1	2.253	0.176	0.031
2	1.523	0.924	0.018
3	0.806	0.097	0.045
4	1.862	0.927	0.019
5	1.740	1.021	0.036
6	0.054	0.044	0.039
7	2.069	0.092	0.037
8 (negativ)	2.460	0.1	0.023
9	2.489	0.225	0.04
10	1.329	0.843	0.035
11	0.032	0.061	0.067
12	2.105	0.412	0.026
14 (negativ)	0.031	0.025	0.028

15	1.984	0.626	0.024
16	1.405	0.116	0.063
17	3.272	0.588	0.028
18 (negativ)	-	0.03	0.029

Evaluarea imunogenicității antigenului AgHDs (Actvitatea 1.2)

Testarea imunogenicității antigenului AgHDs cu metoda ELISA, utilizând standarde din kit-uri comerciale și testarea comparativă a imunogenicității antigenului AgHDs cu un kit comercial și Elisa in-house au fost efectuate cu kitul optimizat și pe probe deidentificate, pozitive pentru anticorpi anti-HBs. OD-urile măsurate sunt prezentate în tabelul următor. Trebuie specificat că kitul comercial pentru detectarea de anticorpi HDV este un kit de Elisa competitiv, deci OD-uri mici indică prezența anticorpilor în probă. În schimb, cu metoda noastră, prezența anticorpilor este indicat de OD-uri crescute. Controalele pozitive și negative sunt din kitul comercial pentru detectarea anticorpilor HDV.

Probă deidentificate	Elisa cu CHBDaAg	Kit comercial delta virus Ab	Kit comercial delta virus Ag
Control negativ	0	1.867	0.039
Control pozitiv	1.599	0.046	3.267
1	3.086	0.038	0.046
2	0.057		
3	0.031		
4	0.063		

Bibliografie

Drain, P.K., Hyle, E.P., Noubary, F., Freedberg, K.A., Wilson, D., Bishai, W.R., Rodriguez, W., Bassett, I.V. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis*. **2014**, *14*, 239-249.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*, 2947-2948

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012 *28*: 1166-1167. Doi:10.1093/bioinformatics/bts091

Usman Z, Velkov S, Protzer U, Roggendorf M, Frishman D, Karimzadeh H. HDVdb: A Comprehensive Hepatitis D Virus Database. *Viruses*. 2020 May 14;12(5):538. Doi: 10.3390/v12050538. PMID: 32422927; PMCID: PMC7290977.

Coordonator proiect

Dr Szilard Fejer

Responsabil partener

Dr Costin-Ioan Popescu