

Raport științific etapa 2

ianuarie - decembrie 2021

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 și a antigenului HBSAg. Un rezultat pozitiv conduce la testarea și 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. Testele validate actuale prezintă parametri 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).

În această etapă s-a asamblat testul imunocromatografic de detecție a anticorpilor anti-VHD și s-a evaluat performanța prototipului în laboratorul de analize medicale (mediu industrial).

Rezultate

Asamblarea stripului LFA (activitatea 2.1)

Pentru a crește șansele de reușită a detecției anticorpilor anti-VHD prin metoda imunocromatografică în format de flux lateral ("lateral flow assay"-LFA), s-a proiectat suplimentar antigenul HDV 60-170 care a fost exprimat și purificat în sistem de expresie procariot după cum s-a descris în secțiunea materiale și metode. Totodată, antigenul HDVL care în etapa precedentă a fost obținut în formă insolubilă, a fost exprimat în formă solubilă prin optimizarea procesului de inducție la 25°C. Cele trei antigene au migrat ca monomeri în SDS-PAGE la masa așteptată (Figura 1).

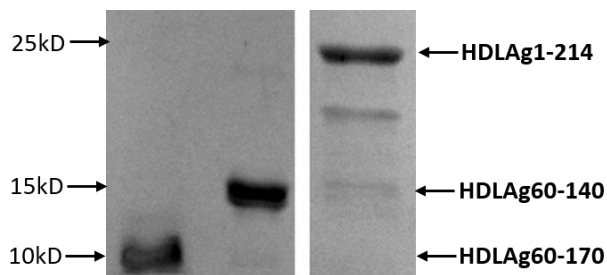


Figura 1 Expresia antigenelor VHD în sistem procariot. Antigenele virale au fost purificate în sistem procariot după cum s-a descris în secțiunea Materiale și Metode. Puritya lor a fost evaluată prin SDS-PAGE și colorarea gelului cu reactiv InstantBlue Commassie (Abcam, US).

În continuare s-a asamblat stripul LFA după cum s-a descris în secțiunea materiale și metode. Pe scurt, cele trei antigene au fost picurate pe membrana de detecție testând un ser unic de la un pacient HDV pozitiv. Membranele testului au fost tratate și asamblate în stripul de LFA (Figura 2A). După cum se observă în Figura 2B, antigenul 1-214 a fost singurul care a permis detecția anticorpilor anti-VHD deoarece conține cele mai multe zone antigenice în comparație cu celelalte două antigene (60-140 și 60-170).

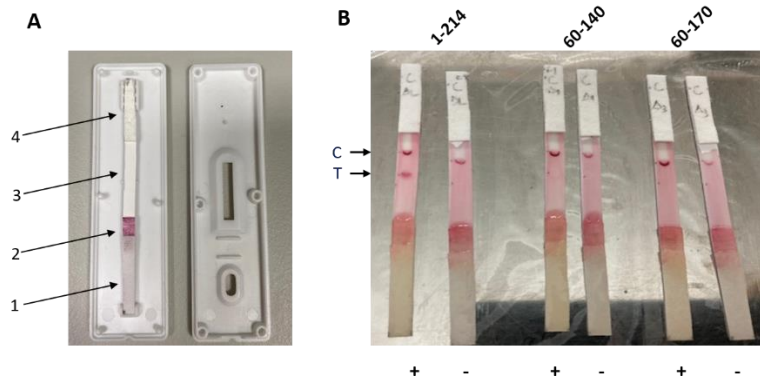


Figura 2. Asamblarea și testarea testului rapid pentru detecția anticorpilor anti-VHD. A) Reprezentarea schematică a testului rapid (1-membrana de aplicare probă, 2- membrana de conjugare, 3-membrana de detecție, 4- membrana de adsorbție, T – linie de test, C- linie control) **B)** Trei antigene (1-214, 60-140, 60-170) derivate de la antigenul VHD-L au fost testate în format LFA. (C- banda control, T-banda test)

Testarea stripului LFA – senzitivitate (activitatea 2.2)

După obținerea antigenelor virale în cantitatea și puritatea necesară asamblării testelor rapide, s-a determinat pentru fiecare antigen capacitatea de detecție a anticorpilor anti-VHD prin ELISA. Astfel s-au evaluat 65 de seruri pozitive pentru ARN genomic VHD și anticorpi anti-VHD și 65 seruri negative pentru antigenul HBs. Prin ELISA s-a observat o senzitivitate crescută (100%) în cazul antigenului 1-214 care a scăzut o dată cu îndepărtarea zonelor antigenice atât pentru antigenul 60-170 (96,9%) cât și pentru antigenul 60-140 (86,1%). Specificitatea testată cu ELISA a fost puțin mai scăzută la antigenul 1-214 (98,4%), și 100% în cazul celorlalte doi antigene. Menționăm că specificitatea se poate mări cu mărirea valorii de cut-off până la o densitate optică de 0,5, toate serurile pozitive testate având densități optice măsurate mai mare de 1 (Figura 3).

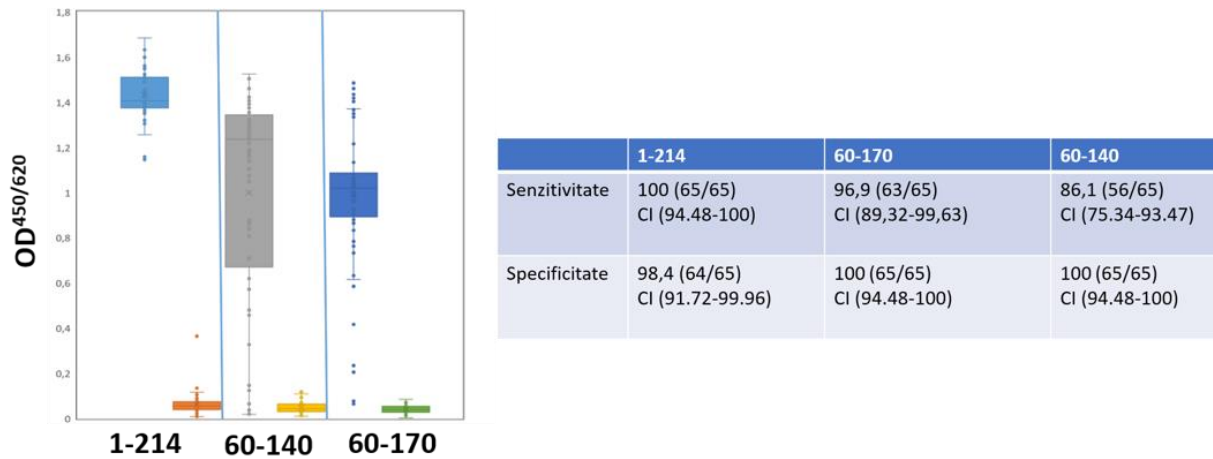


Figura 3. Densitățile optice măsurate cu ELISA pentru cele 3 antigene pentru probe pozitive (coloana stângă) și negative (coloana dreaptă), și date de senzitivitate și specificitate calculate cu intervale de confidență.

Prin metoda imunocromatografică s-au testat 50 de seruri pozitive pentru ARN genomic VHD și anticorpi anti-VHD folosind antigenul 1-214. S-a determinat o senzitivitate a testului de 75% care va fi crescută în viitor prin creșterea concentrației de antigen viral. Pentru determinarea specificității s-au folosit 25 de seruri anti-VHD negative. Specificitatea obținută a fost de 100%.

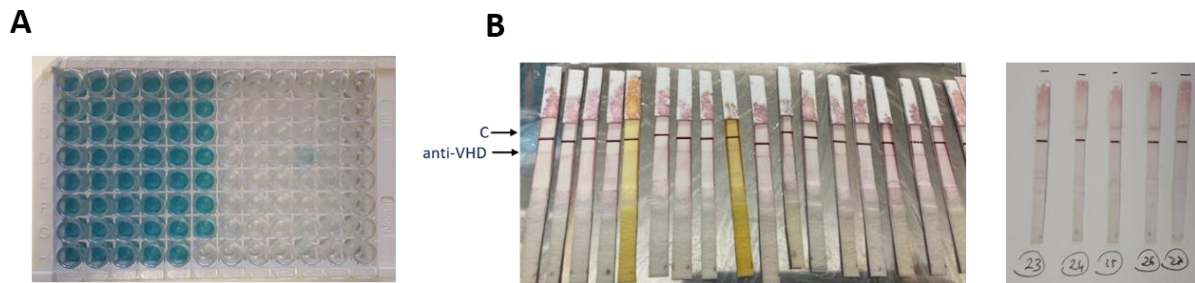


Figura 4. Exemple privind evaluarea antigenelor virale în format ELISA și LFA pentru antigenul 1-214. **A)** Pe placa ELISA au fost testate 47 probe pozitive și 49 probe negative; **B)** 50 de probe pozitive (panel dreapta) și 27 de probe negative pentru anticorpi anti-VHD au fost testate în format LFA (C- banda control, anti-VHD-banda test).

Optimizare detecție HBsAg prin LFA (activitatea 2.4)

După detecția anticorpilor anti-VHD s-a continuat cu optimizarea detecției HBsAg in LFA. Pentru aceasta s-au evaluat mai multe perechi de anticorpi monoclonali de captură/detecție. Figura 5A arată că perechea de anticorpi 2/3 este cea mai potrivită pentru detecția HBsAg. Astfel am continuat optimizarea variind concentrația de anticorpi de detecție 3 punându-se în

evidență o corelație directă între concentrația anticorpului de detecție și intensitatea semnalului (Figura 5B).

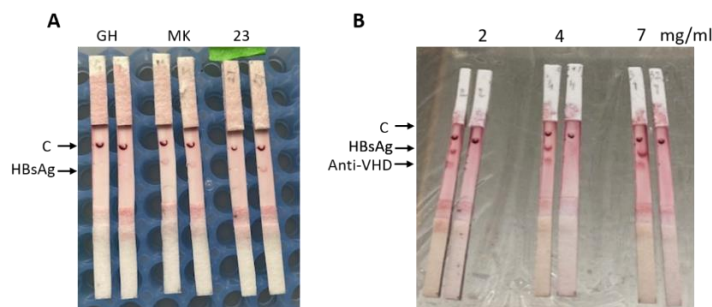


Figura 5. Optimizarea detectiei antigenului HBs in format LFA. A) Trei perechi de anticorpi anti-HbSAg au fost testate pentru detectia HBsAg.**B)** S-au spotat stripuri cu concentratii diferite de anticorp de captura 3 (HBsAg) si antigen VHD (anti-VHD) care au fost utilizate in evidentierea antigenului HBs si, respectiv anticorpilor anti-VHD.

Diseminare (activitatea 2.3)

Rezultatele obținute au fost prezentate în cadrul simpozionului omagial „Institutul Cantacuzino, 100 de ani în slujba sănătății” care s-a desfășurat online în perioada 25-27 noiembrie 2021.

Test rapid multiplex pentru screeningul virusurilor hepatice VHC/VHB/VHD Lia Cucos¹, Eduard Nedeia¹, Monika Korodi², Laurentiu Spiridon¹, Daniel Ion¹, Alina Ghionescu¹, Kinga Rakosi², Zsuzsanna Jenei², Szilard Fejer², Costin-Ioan Popescu¹ (1-Institutul de Biochimie al Academiei Române, Bucuresti, Romania; 2- Pro-Vitam SRL, Sfântu Gheorghe, Romania).

Sfântu Gheorghe / București, la 10.12.2021

Coordonator proiect

Dr Szilard Fejer

Responsabil partener

Dr Costin-Ioan Popescu