

## Raport științific final

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 testarea în laboratorul de analize medicale a unui kit prototip de diagnostic rapid multiplex pentru detecția simultană a antigenului de suprafață al VHB (AgHBs), anticorpilor anti-VHC și anti-VHD (VHC/VHB/VHD). În timpul proiectului s-au asamblat și validat teste în format ELISA folosind antigenele produse în cadrul acestui proiect.

## Rezultate

### ***Clonarea si 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.

Astfel, a fost extras un set de 979 de secvente proteice din baza de date Genbank. Aceste secvente au fost verificate fata de bazele de date VHDdb (Usman et al, 2020) si ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>). A fost efectuata o aliniere multipla cu suita Clustal. Pentru delimitarea cat mai exacta a genotipurilor au fost construiti intr-o maniera iterativa o serie de arbori filogenetici cu algoritmul de clusterizare "neighbour joining" (NJ) si o serie de matrici de identitate PIM. Rafinarea arborilor s-a facut prin analiza sub-blocurilor matriceale. Astfel a fost extras un subset de 540 de secvente din genotipul 1. Secventele prezinta o variabilitate de bloc manifestata prin prezenta unei regiuni de ~20 aa la capatul C-terminal. Aceasta regiune a fost eliminata pentru a nu interfera cu calculele de similaritate intrucat nu este intr-o regiune antigenica de interes. Dupa aliniere, a fost obtinuta cate o secventa consensus: HDV-LAg<sub>cons</sub>.

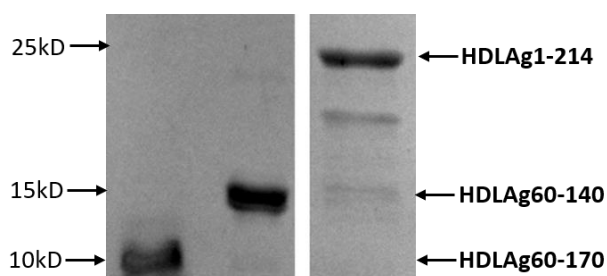
Al doilea pas s-a constituit din extragerea secventelor din genotipul 1 cu scorul de reprezentativitate maxima. Acest scor a fost definit in 3 moduri : suma identitatilor cu celelalte secvente, suma similaritatii cu celelalte secvente si identitatea fata de secventa consens. Pentru obtinerea acestori scoruri au fost recalulate matricile de identitate PIM si toate 3 au condus la acelasi rezultat : secventa cu ID-ul GeneBank AVXXXXXX.X si ID-ul UniProt AXXXXXXXXX. Secventele antigenelor VHC au fost obtinute printr-o strategie similara in proiectul PED 195/17.08.2017. Secventa antigenelor a fost clonata in vectorul de expresie procariota pet24A dupa cum s-a descris in materiale si metode.

Secvența	Regiune cu antigenicitate crescuta
AVxxxxxx.x _VHD	1-214
AVxxxxxx.x _VHD	60-140
AVxxxxxx.x _VHD	140-214

Tabel 1. Secvențele antigenelor VHD.

### **Asamblarea stripului LFA (activitatea 2.1)**

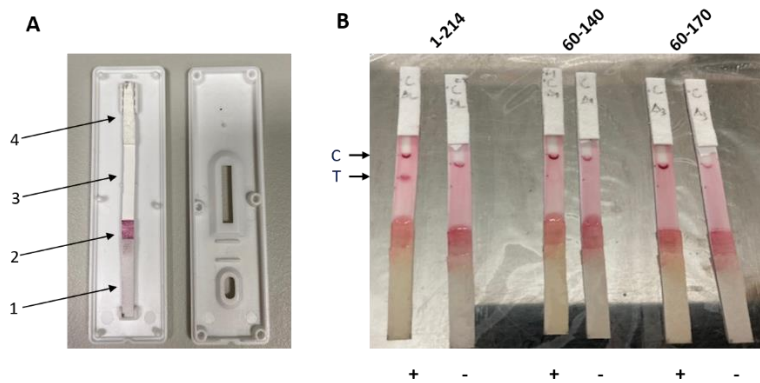
Pentru a crește șansele de reușită a detecției anticorpilor anti-VHD prin metoda imunocromatografică în format de flux lateral ("lateral flow assay"-LFA), s-a proiectat suplimentar antigenul HDV 60-170 care a fost exprimat și purificat în sistem de expresie procariot după cum s-a descris în secțiunea materiale și metode a raportării aferente etapei 2. 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 Coomassie (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

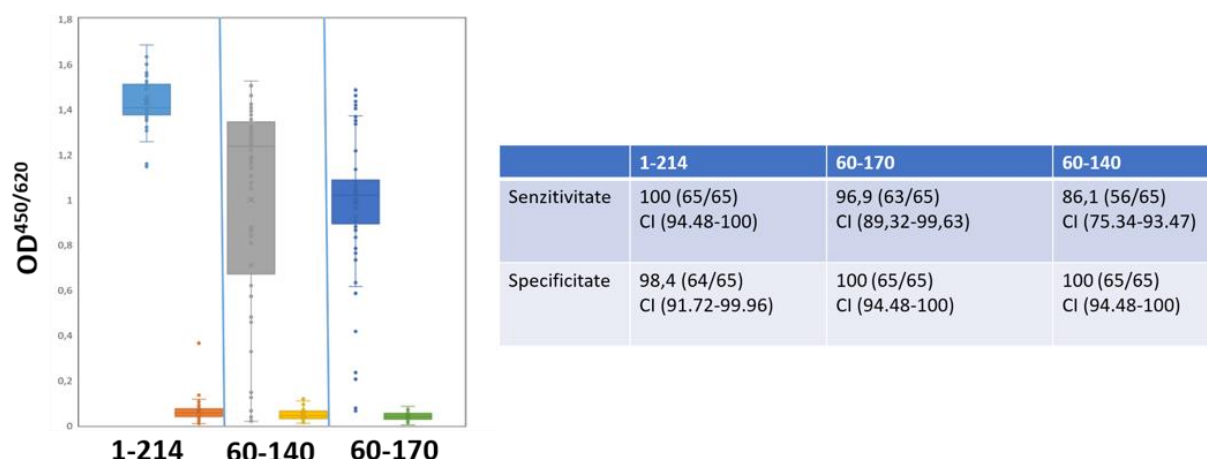
cele mai multe zone antigenice în comparație cu celelalte două antigene (60-140 și 60-170).



**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)

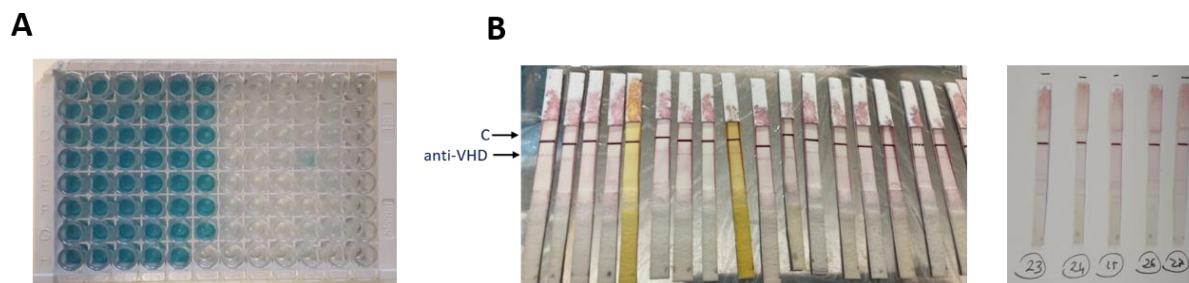
### ***Testarea stripului LFA – sensibilitate (activitatea 2.2)***

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 sensibilitate 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).

Activitățile și rezultatele aferente etapei 3 sunt prezentate într-o ordine care ajută la o mai bună înțelegere a conexiunilor între acestea:

### **Asamblarea kitului (activitatea 3.3)**

Pornindu-se de la stripul asamblat in etapa 2 (activitatea 2.2) pentru detectia anti-VHD, s-au trasat benzi de detectie cu antigen VHD concentrat (1.5 mg/ml) si, respectiv un amestec de anticorpi monoclonali de detectie a antigenului HBs (Figura 4 stanga). Pentru o schema de testare duala initiala HCV/HBV s-a asamblat si o caseta de test rapid pentru anti-VHC/HBsAg. Pentru banda de detectie a anticorpilor anti-VHC s-a dispensat un amestec de antigene virale VHC (core si NS3 – 1.5mg/ml). In ciuda incercarilor de optimizare nu s-a obtinut disparitia totala a semnalului in proba negativa pentru anticorpi anti-VHC ceea ce duce la o specificitate scazuta a testului. Aceasta va fi imbunatatita prin schimbarea tamponelor de stocare ale antigenelor VHC folosite (Figura 5 dreapta).



**Figura 5:** Asamblarea casetelor de test rapid VHD/VHB si VHC/VHB.

### ***Testarea stripului LFA – teste de specificitate (activitatea 3.1)***

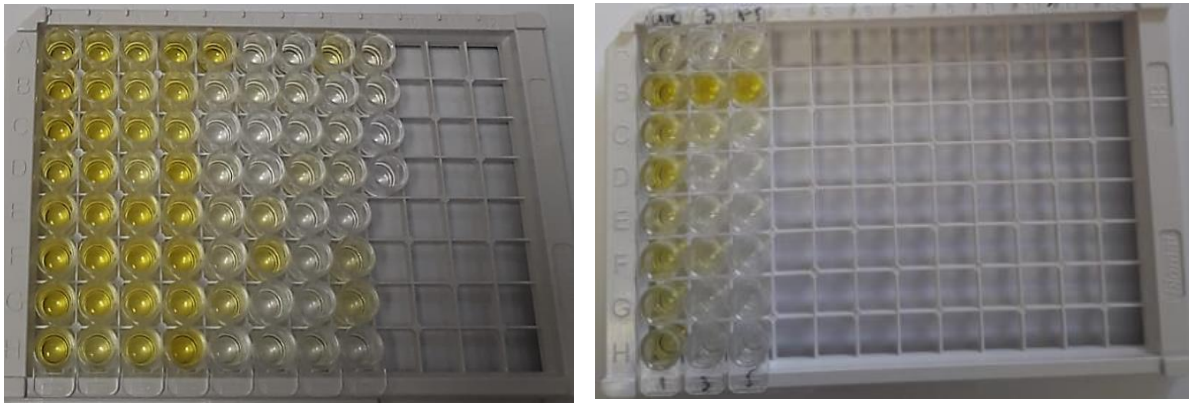
Pentru testarea specificității s-au utilizat seruri negative pentru anti-VHC, antigenul HBs si implicit anti-VHD. Din cauza problemelor tehnice descrise mai sus, nu s-a evaluat specificitatea casetei VHC/VHB. S-a obtinut o specificitate de 76% (3/13) pentru detectia anti-VHD si, respectiv 93% pentru antigenul HBs (1/13). Se va imbunatati specificitatea testului pentru detectie anticorpi anti-VHD prin cresterea stringentei tamponului de migrare.

### ***Validarea kitului si transfer la operatorul economic (activitatea 3.4)***

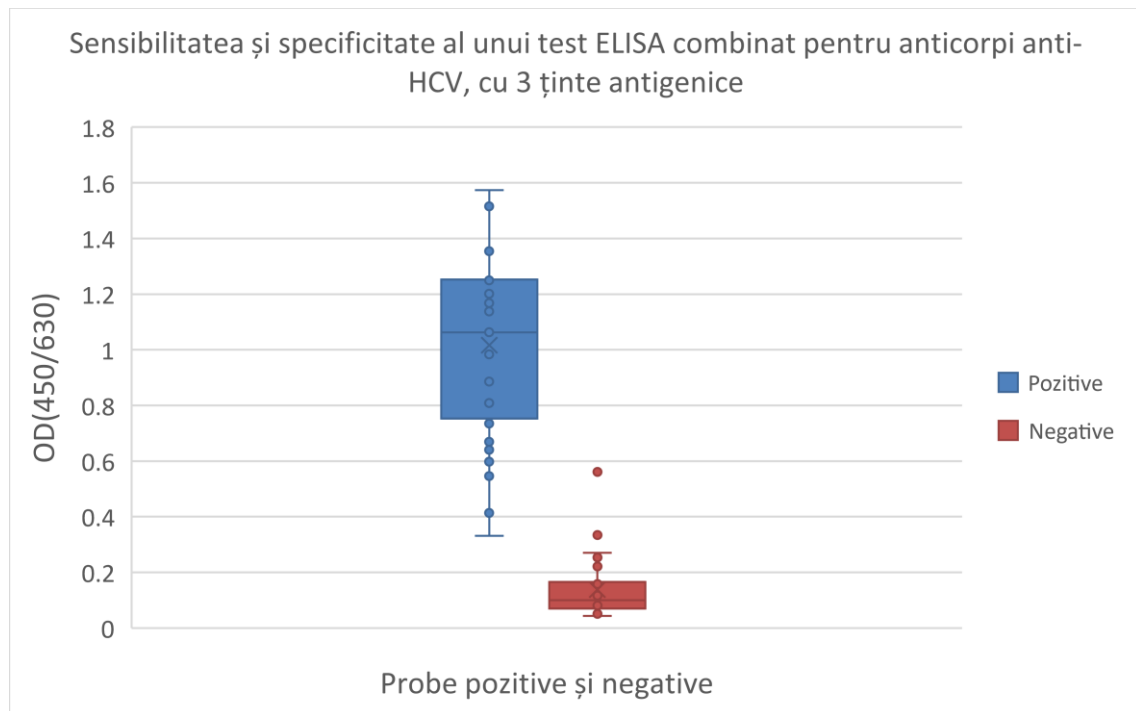
Kitul de testare rapidă pentru VHB și VHD s-a validat pe un lot de 58 probe de ser HBsAg/anti-HDV pozitive și 13 probe de ser HbSAg/anti-HDV negative. S-a obținut o sensibilitate de **100%** (58/58) pentru detectia anticorpilor anti-VHC și 53% (27/58) pentru antigenul HBs. Se va evalua tehnica de fabricare și alte perechi de anticorpi anti-HbsAg pentru creșterea sensibilității.

**Testarea kitului in laboratorul de analize (activitatea 3.5)**

Utilizând un test ELISA combinat cu 3 ținte antigenice produse de IBAR, am obținut o sensibilitate de 100% pe 33 de probe pozitive pentru anticorpi anti-HCV, și o specificitate de 81%, calculate din 33 de probe negative. Semnalele obținute la 6 probe negative au fost confirmate ca fals pozitive prin repetarea determinărilor cu test rapid anti-HCV și ELISA comercial, toate cele 6 probe neavând semnal pe aceste kituri. De aceea am procedat la determinarea cauzei semnalului nespecific, prin repetarea determinărilor ELISA pe plăci cu o singură țintă antigenică adsorbită (Figura 6 stânga).



**Figura 6:** Testul de specificitate și sensibilitate a kitului ELISA anti-HCV asamblat. Primele 33 de probe sunt pozitive, urmate de 33 probe negative și 2 de probe blank (Stânga). Panelul din dreapta: Rezultatul experimentelor pe o singură țintă antigenică la cei 6 probe fals pozitive (3 stripuri). Primele două poziții (A și B) sunt controale negative și pozitive.



**Figura 7:** Distribuția densităților optice măsurate pentru probe pozitive și negative.

Proteina core este ținta în primul strip, și probabil puritatea acestuia nu este ideală pentru determinări ELISA (Figura 6 dreapta). Utilizând un cutoff de  $OD=0.3$ , specificitatea kitului ELISA fără proteina core ar crește la  $>97\%$  (Figura 7). Astfel, considerăm că testul ELISA anti-HCV dezvoltat prin proiect are potențialul de a fi la fel de performant ca testele comerciale cu marcaj CE IVD.

Testarea anticorpilor anti-HBsAg prin utilizarea protocolului descris mai sus a arătat că acești perechi de anticorpi sunt mult mai dificili de utilizat într-un kit ELISA. Am obținut semnale la 7 din 20 probe pozitive pentru AgHBs (sensibilitate de 35%) și niciun fals pozitiv la 20 de probe negative (specificitate de 100%) la una dintre perechi, dar la cealaltă nu am obținut semnal diferit între probele pozitive și negative. Îmbunătățirea protocolului este necesară pentru a crea un kit ELISA pentru AgHBs. Toate cele 20 de probe pozitive au fost confirmate pozitive cu un kit ELISA comercial pentru detecția AgHBs.

Datele obținute arată că este esențial controlul de calitate al proteinelor produse, și metoda ELISA este o metodă convenabilă pentru acest control. Astfel, în protocolul de producție pe scară industrială, sensibilitate și specificitatea testelor va trebui reevaluată la fiecare lot produs.



### **Diseminarea rezultatelor (activitatea 3.2)**

La data de 5 mai 2022, s-a organizat un workshop cu tema *Testarea rapidă în lupta de eradicare a hepatitelor virale* cu agenda de mai jos (Figura 8). În cadrul acestui workshop s-a discutat rolul și utilitatea testului multiplex în atingerea rezoluției OMS pentru eradicarea hepatitelor virale până în 2030.

- 16:00-16:10 – Deschiderea evenimentului  
*Costin-Ioan Popescu, IBAR, București*
- 16:10-16:20 – Test rapid pentru screening multiplex al hepatitelor virale B, C, D  
*Costin-Ioan Popescu, IBAR, București*
- 16:25-16:40 – Programul național de tratament și screening al hepatitelor virale  
*Anca Streinu Cercel, INBI “Dr. Matei Balș”, București*
- 16:45-17:00 – Programul de screening Livero-2 – spre eradicarea hepatitelor virale până în 2030  
*Anca Trifan, Institutul De Gastroenterologie și Hepatologie, Iași*
- 17:05-17:20 – Screeningul pentru hepatite virale în cabinetul medicului de familie  
*Sandra Alexiu, președintele Asociației Medicilor de Familie București-Ilfov*
- 17:25-17:40 – Utilitatea testelor de screening pentru infecția cu virus hepatic B, D și C, din prisma sănătății publice  
*Odette Popovici, Institutul Național de Sănătate Publică, București*
- 17:40-18:05 – Masa rotundă – utilitatea testelor rapide pentru detecția hepatitelor virale și accesul pacientului la tratament
- 18:05-18:10 – Închiderea evenimentului:  
*Szilard Fejer, Provitam, Sf. Gheorghe*



**Figura 8:** Imagini din timpul workshopului *Testarea Rapida in lupta de eradicare a hepatitelor virale*.

### **Proprietatea intelectuală - PI (M3.4 – Stabilirea participării partenerilor la PI)**

Se va depune un patent care protejează utilizarea antigenului VHD cu o anumită secvență ca antigen de captură în identificarea calitativă a anticorpilor anti-VHD de genotip 1 în format ELISA sau imunocromatografie în flux lateral. Patentul va fi depus de Institutul de Biochimie al Academiei Române (IBAR) ca aplicant. Kitul ELISA pentru detecția infecției cu HDV cu antigenul HDV Large produs de IBAR are deja sensibilitate și specificitate comparabilă cu kituri comerciale, astfel tehnologia este pregătită pentru licențiere către producători de teste cum ar fi Proel Biotech SRL, un spinoff al Pro-Vitam SRL pentru parcurgerea etapelor de validare în teste clinice certificate de instituții externe pentru obținerea numărului CE. Testul rapid în format multiplex este în format MVP (minimal viable product) și a fost acceptat în programul de mentorat și valorizare a inovării LIF Global 2022 organizat de către Royal Academy of Engineering (<https://www.raeng.org.uk/global/sustainable-development/leaders-innovation-fellowships/lifglobal>). Proprietatea intelectuală privind protocoalele Elisa dezvoltate în cursul proiectului va rămâne la Pro-Vitam.

Sfântu Gheorghe / București, la 19.05.2022

Coordonator proiect

**Dr Szilard Fejer**

Responsabil partener

**Dr Costin-Ioan Popescu**