

Hepatite B et Delta

Applications des nouveaux marqueurs

Professeur Françoise Lunel Fabiani

Virologie, Angers

France

HBV virus: hepadnaviridae - Orthohepadnavirus

HBsAg: Envelope proteins

- Large
- Medium
- Small

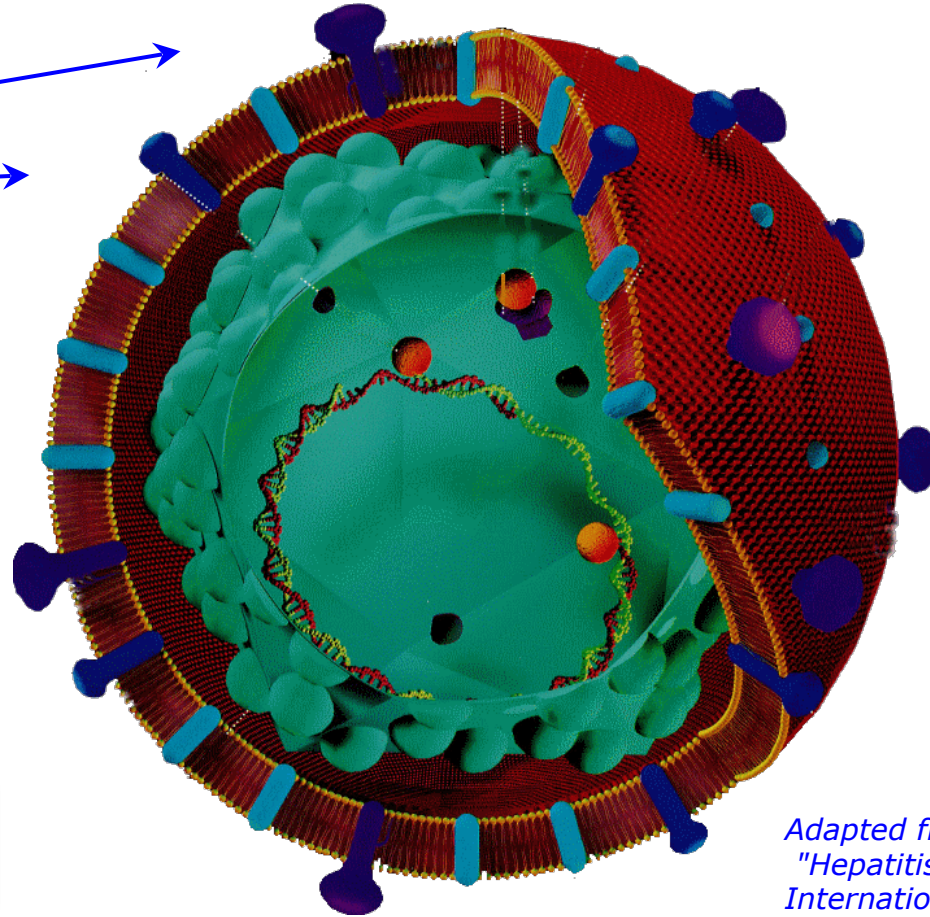
HBcAg: Capsid or Core

POL: polymerase

DNA: 3200 nt.

✓ partially double stranded

RNAs..., m pg etc.



Adapted from:
"Hepatitis B virus"
International Medical Press (2002)

Marqueurs du VHB : de quoi avons nous besoin?

Dépistage des personnes infectées

- Tout venant et DDS
- Infection B occulte ?

AgHBs HS (US)
qAnti-HBc

Suivi des infections chroniques et des traitements

Règles d'arrêt

- Marqueurs **circulants**
 - qHBsAg, HBcrAg
 - ADN, **ARN**
- Marqueurs **intrahépatiques**
 - cccDNA - mRNA

Mieux : combinaison de
marqueurs
directs (Ag-Ac. Nuc.)
et indirects (Ac) ?

Confirmation de la "guérison"

- cccDNA / ADN intégré

Suivi des nouveaux traitements...

Anciens marqueurs tests rapides

Tests Rapides pour la Détection de l'AgHBs

	Alere Determine™ HBsAg	VIKIA® HBsAg	DRW HBsAg rapid Test	Toyo HBsAg Rapid Test	Assure® HBsAg rapid test
Manufacturer	Alere USA	bioMérieux France	DRW Ltd. USA	Turklab Turkey	MP Biomedicals Singapore
Specimen type	Whole blood, serum, plasma	Whole blood, serum, plasma	Serum, plasma	Whole blood, serum, plasma	Whole blood, serum, plasma
Volume needed (µL)	50	75	80	100	50 75 (S,P)
Time required (min)	15	5-15	30	5-15	15-20

Performances des TDR pour la Détection de l'AgHBs (Sang Total)

2472-3928 individus testés (variable selon le test)

Tests interprétables dans la majorité des cas

(Determine™ : 100%; Vikia® : 99,8%; Quick Profile™ : 98,1%)

Tests	Spécificité	Sensibilité
Determine™	100%	93,6%
VIKIA®	99,9%	96,5%
Quick Profile™	99,7%	90,5%

Performances des TDR pour la Détection de l'AgHBs (Sang Total)

773 individus issus de 2 études du programme PROLIFICA en Gambie ont été inclus

Tests	Spécificité	Sensibilité
Determine™	100%	88,5%
VIKIA®	99,8%	90,0%

QUANTIFICATION DE L'AGHBs

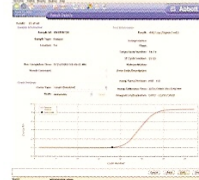
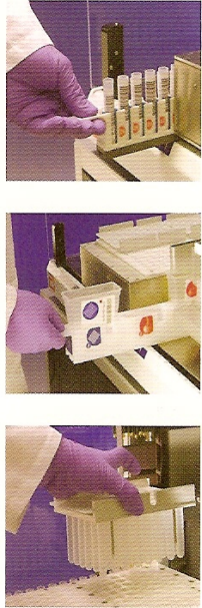
Intérêt clinique

- Patients AgHBe positifs traités :
 - marqueur prédictif de la réponse à l'interféron,
 - règles d'arrêt du traitement à S24, qAgHBs>20 000 UI/L,
 - sous NUC, tendance également
- Patients AgHBe négatifs avec ADN< 2000 UI/L :
 - renseigne sur l'activité réelle de la maladie...
 - moins intéressant chez les patients traités

MARQUEURS MOLECULAIRES VHB

HBV DNA automates for therapeutic follow-up

HBVDNA Quantitative by real time PCR



TaqMan (Roche), M2000 (Abbott),
Qiagen, Siemens, Cepheid

Molecular POCT



Alere™ q



Genexpert™ I

Les DBS une possibilité bien validée

Avantages

- Bonne stabilité de la matrice biologique
- Faciles à collecter et possibilité d'acheminement par voie postale à température ambiante
- Analyses sérologiques et moléculaires possibles

Inconvénients

- Plus faible sensibilité analytique (1Log)
- Nécessité d'un stockage à -20°C

Tests génériques :

« Validation and scale-up of Hepatitis B viral load on polyvalent open PCR platforms in West African and South East Asian countries: A study of the AC12 working group » (ANRS 12327)

Agreement between the assays. Cohen's Kappa coefficients for Omunis and Biocentrix Generic OPP, Roche and Abbott nucleic acid tests

NAT	Country	< LOD	LOD – 2,000 (IU/ml)	2,001 IU -20,000 (IU/ml)	20,001 – (IU/ml)
Omunis/Roche	Vietnam	0.802	0.811	0.309	0.836
	Cambodia	0.719	0.671	0.737	0.92
	Mauritania	0.937	0.713	0.525	0.883
Biocentric/Roche	France (MTP)	0.98	0.486	0.518	0.838
	Cote Ivoire	0.729	0.654	0.265	0.903
Omunis/Abbott	Burkina Faso	0.738	0.472	0.529	0.922
	Cameroun	0.776	0.493	0.584	0.885
Biocentric/Abbott	France (Rouen)	0.950	0.827	0.891	0.958
	Thailand	0.867	0.684	0.822	0.956

- < 0 Poor
- 0–0.2 Slight
- 0.21–0.4 Fair
- 0.41–0.60 Moderate
- 0.61–0.8 Substantial
- > 0.81 Almost perfect

% of concordance ranging from 81 to 99

Technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay) Alternative moins couteuse et plus rapide que la PCR, validée par l'OMS adaptée au VHB/PED

- Méthode semi quantitative rapide (60 minutes), coût réduit (US\$ 8/assay)
- Ne nécessitant pas de thermocycleur
- Permet de détecter les fortes charges virales $\geq 200,000$ IU/mL*
- Intérêt pour repérer les femmes enceintes à risque de transmission éligibles pour un traitement antiviral préventif

*Sensibilité et spécificité de 91.1% et 86.0%, pour HBV DNA $\geq 20,000$ IU/mL; et 98.0% et 94.6% pour $\geq 200,000$ IU/mL

PLACE DES NOUVEAUX MARQUEURS DU VHB

IMMUNO-SÉROLOGIQUES (QAGHBs, HBcRAG, QAcANTI-HBc
ET MOLÉCULAIRES (ADNccc, ARN)

QAGHBs US :

AMÉLIORATION DE LA SENSIBILITÉ DES TESTS

Nouveaux tests Q AgHBs : sensibilité très accrue...

Name	Fujirebio Lumipulse® G HBsAg-Quant	Abbott HBsAg Quant	DiaSorin Murex HBsAg Quant	Roche HBsAg II Quant
Technology	CLIA	CMIA	CLIA	ECLIA
Format	Quantitative Sandwich			
Intended Use	Qualitative and quantitative determination of HBsAg in serum or plasma	Quantitative determination of HBsAg in human serum or plasma	Quantitative determination of HBsAg in human serum or plasma	Quantitative determination <u>in confirmed</u> HBsAg human serum or plasma
Reference	WHO Second International Standard, 00/588, subtype adw2, genotype A			
Calibration Range (IU/mL)	0.005 – 150	0.05 - 250	0.05 - 150	0.05 - 130 (13 000/52 000)
Automation	Lumipulse® G	Architect	Liaison® XL	Elecsys, Cobas e411 (1/100) Modular, cobas e601-602 (1/400)
Antibodies	2 Mabs on solid phase 2 Mabs – AMPPD labelled	2 Mabs on solid phase 1 Pab - acridinium labelled	3 Mabs on solid phase 4 Mabs - isoluminol labelled	2 Mabs 1 Mab and 1 Pab -ruthenium labelled

INTÉRÊT EN TRANSFUSION ET POUR DÉTECTER DES INFECTIONS OCCULTES, PERTINENCE CLINIQUE A DÉFINIR
(RÉACTIVATIONS?*)

*lymphomes sous Rituximab, Kusumoto et al J Hepatol 2020

Quantification des isoformes de l'AgHBs (grande (LHBs) et moyenne protéine (MHBs)): nouveau marqueur dans le suivi?

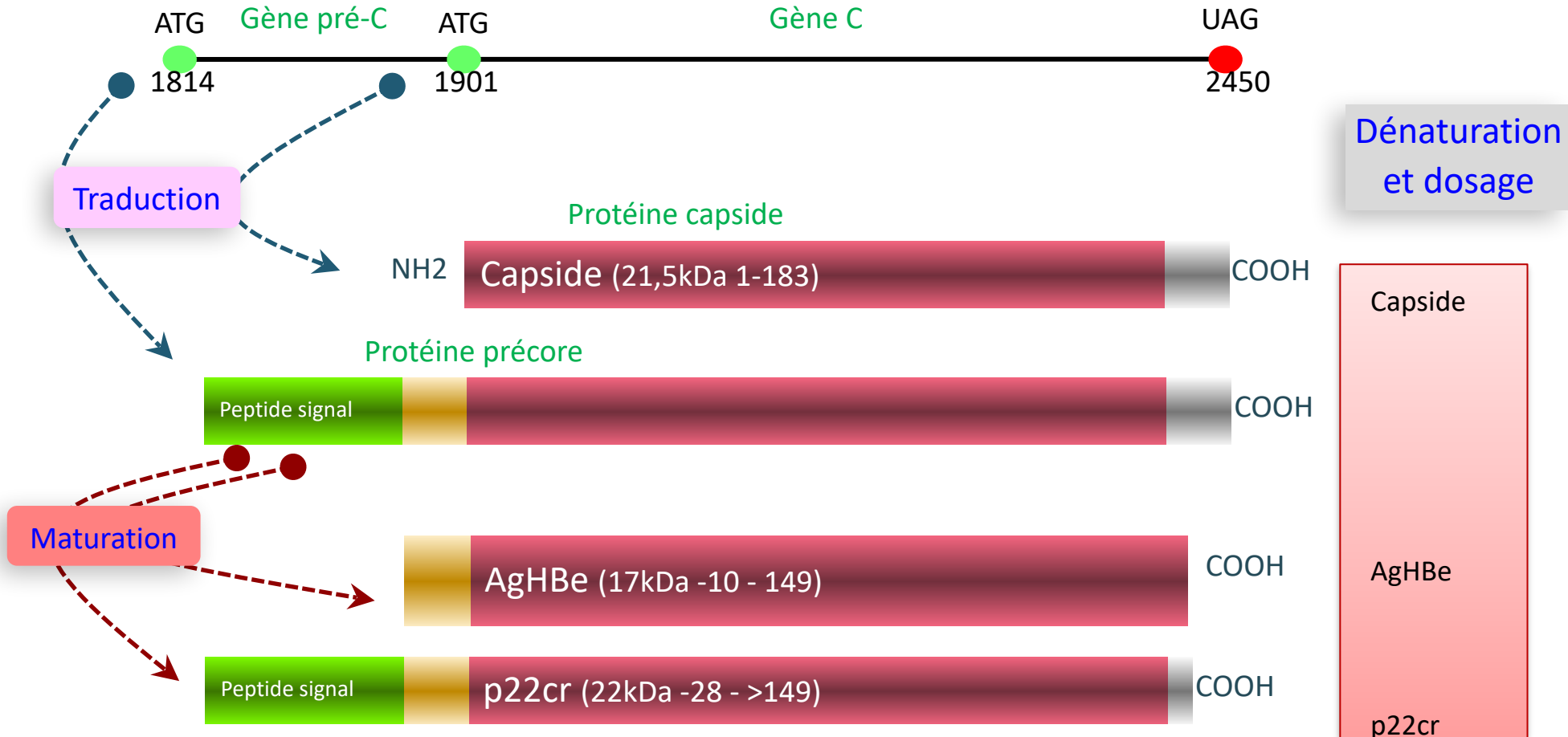
- % plus faible dans les formes inactives
- MHBs prédictif de la perte de l'AgHBs chez les patients AgHBe positifs

Pfefferkorn et al, 2020

ET L'HBcRAG

L'HBcrAg : HBc related antigens

Attention à l'impact de l'AgHBe !

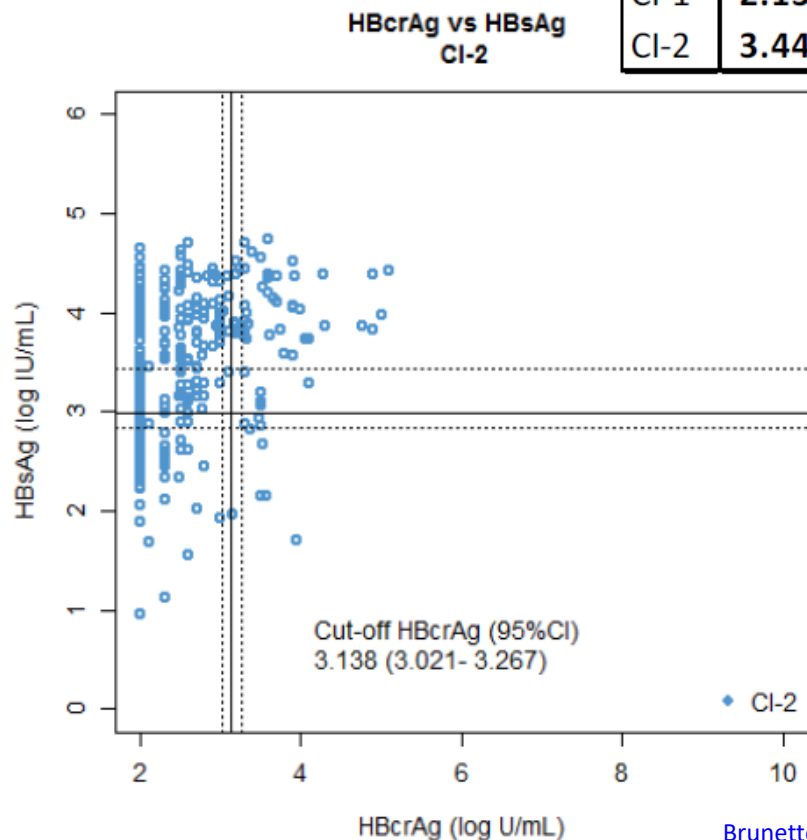
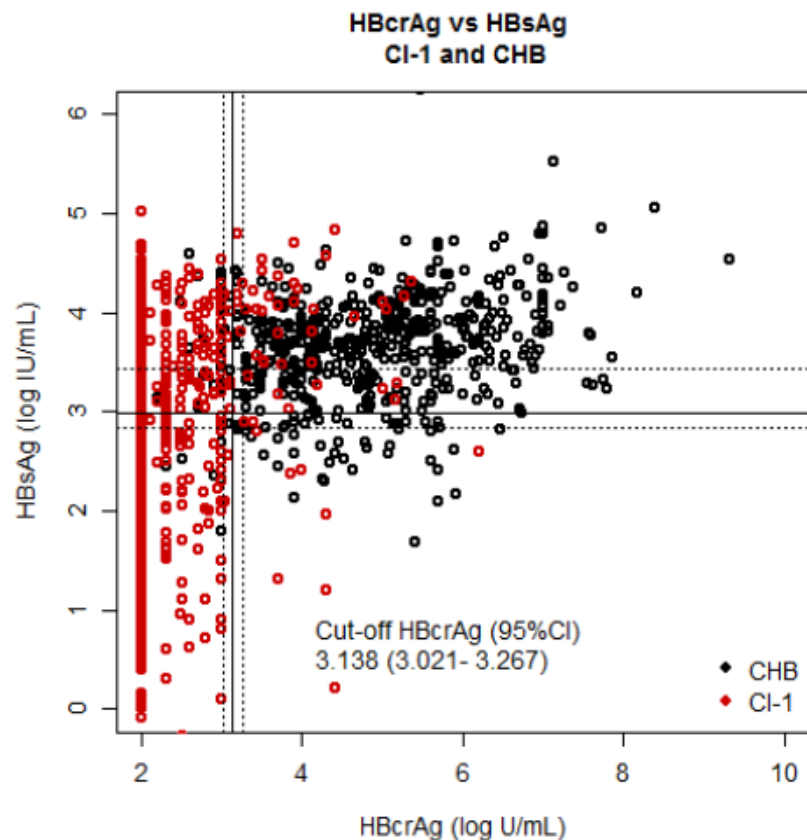


HBcrAg : utilité

Utilité pour dissocier le statut infection vs. Hépatite chez les sujets AgHBe-

- chronic hepatitis B (CHB, N=550),
- chronic infection B (CI-1, N=710),
- chronic infection with fluctuating low viremia HBV DNA <20,000 IU/mL, (CI-2, N=322).

Median values (log) of HBV markers by Clinical categories						
	HBV DNA		HBsAg		HBcrAg	
	median	IQR	median	IQR	median	IQR
CHB	5.67	1.80	3.63	0.67	4.83	1.80
CI-1	2.13	1.22	2.74	1.57	2.34	0.50
CI-2	3.44	0.64	3.52	0.96	2.58	0.97



HBCrAg : UTILITÉ ?

- Intérêt principal: patient AgHBe négatif
- Désavantage : Pb spécificité, reproductibilité, nécessité d'un automate dédié, des tests rapides seraient intéressants.

QUANTIFICATION DES ANTI-HBc : INTERET

- Taux plus élevés durant les phases "hépatites" comparées aux "infections".
- Le titre anti-HBc corrèle avec le niveau des transaminases, l'histoire naturelle et la réponse aux traitements.
- Plus le titre est élevé plus la probabilité de faire une séroconversion sous traitement (AN ou IFN) est importante.

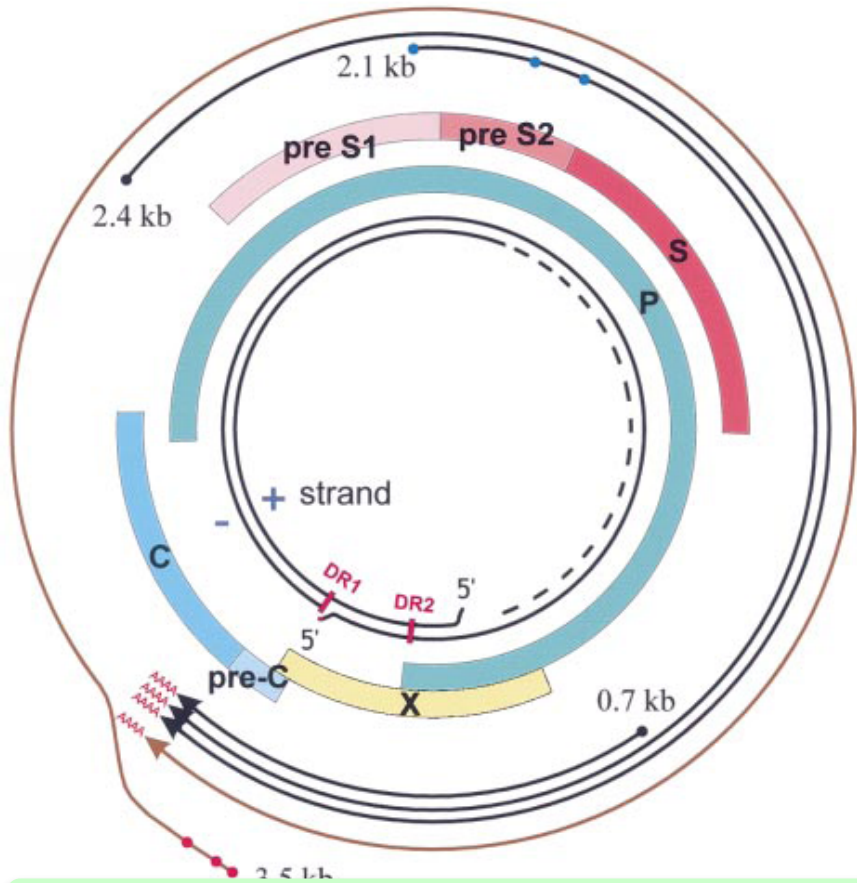
ADNccc QUANTIFICATION

- Le nb de copies par cellule infectée est faible et sa structure le rend difficile à amplifier
- La standardisation de sa quantification fait l'objet d'un projet international (ANRS-DZIF soutenu par ICE HBV)
- Une quantification standardisée permettrait d'apprécier l'efficacité réelle des anciens et nouveaux traitements

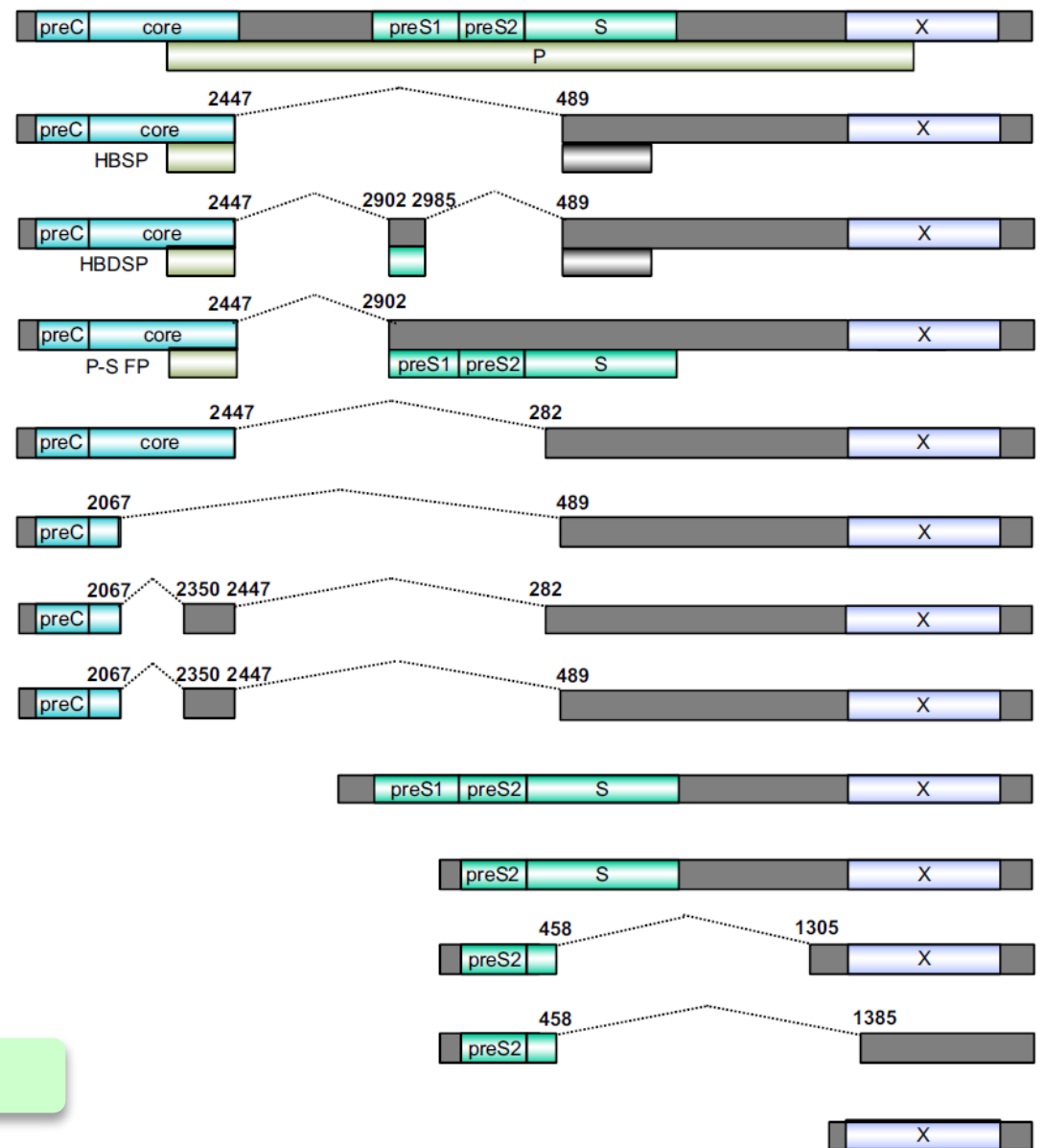
Technique récente plus sensible (Tu et al , 2020)

ARN VIR AUX

Les ARN : Une population complexe



Systèmes de quantification hétérogènes; absence de standard

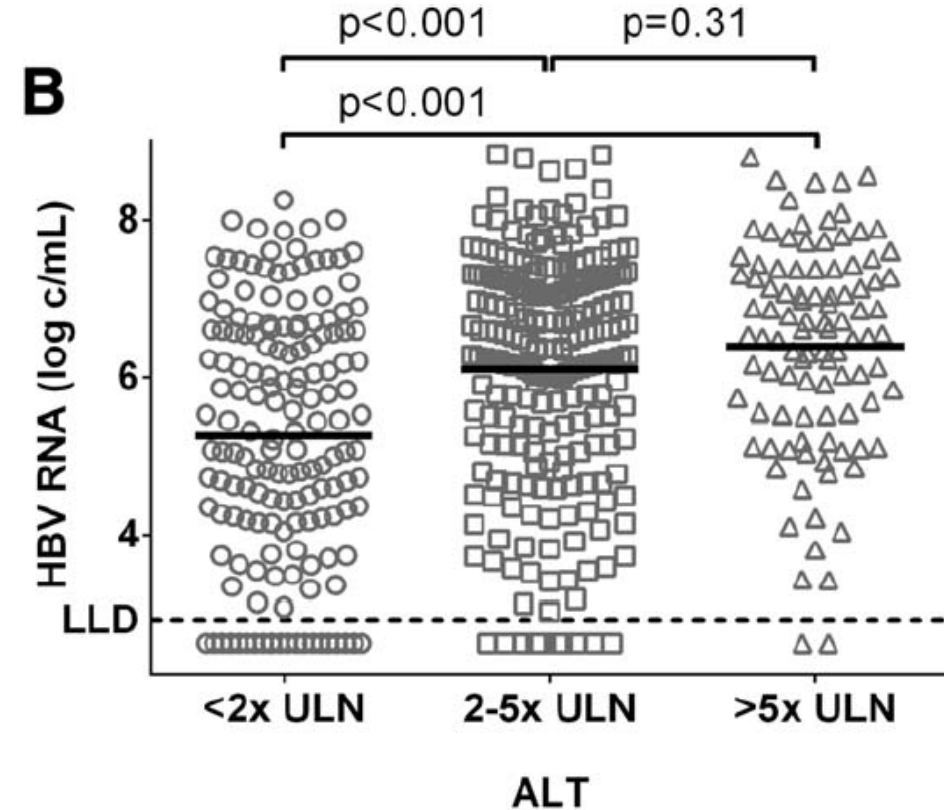
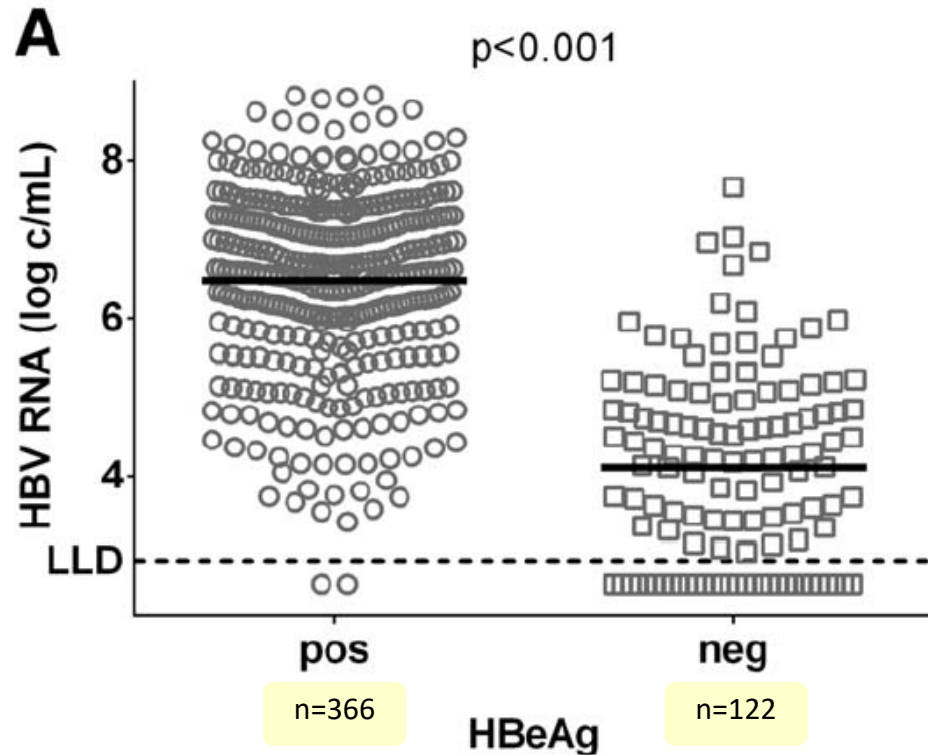


ARN VIRAUX

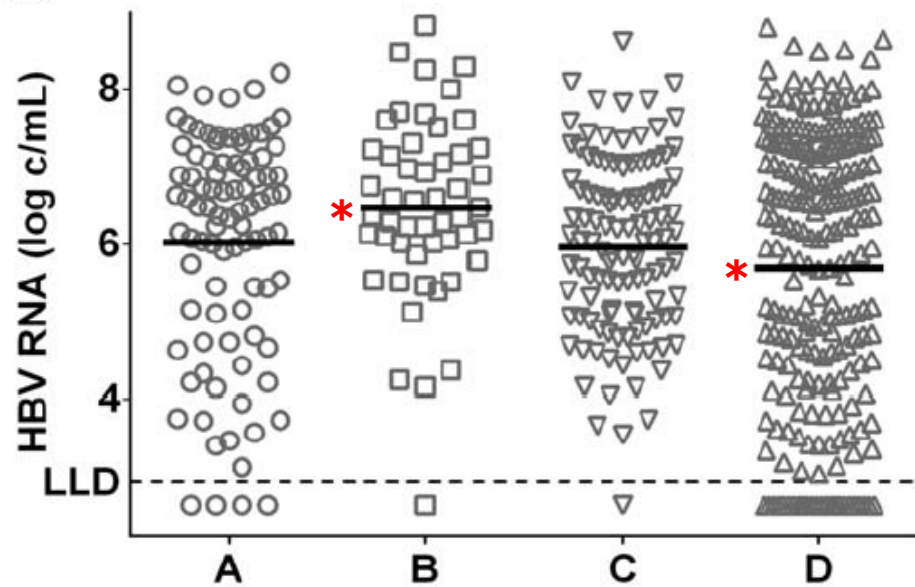
- Reflet de l'activité transcriptionnelle du cccDNA chez les patients AgHBe positifs
- Prédicatif de la séroconversion HBe
- Prédicatif de la rechute virologique à l'arrêt du traitement
- Attention !! pas de technique standardisée et variabilité en fonction de l'AgHBe, du génotype et des mutations précore!

Impact des facteurs liés à l'hôte ou au virus sur le niveau d'ARN

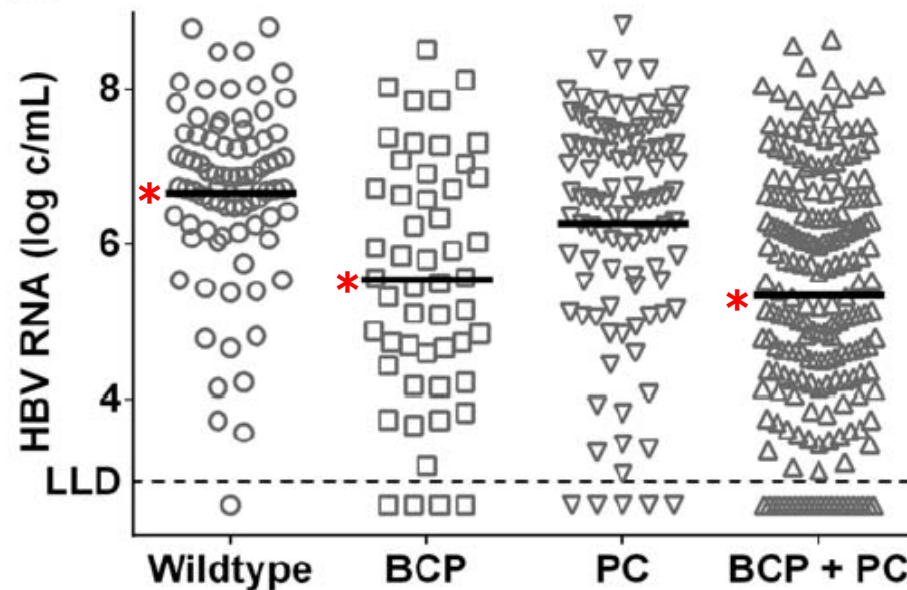
Cohorte multiethnique de 488 porteurs chroniques non traités



Influence du génotype et des variants "précore"



A vs. B: $p=0.58$ B vs. C: $p=0.30$
A vs. C: $p=1.00$ B vs. D: $p=0.003$
A vs. D: $p=0.27$ C vs. D: $p=0.41$



Wildtype vs. BCP: $p<0.001$ BCP vs. PC: $p=0.03$
Wildtype vs. PC: 0.46 BCP vs. BCP + PC: $p=1.00$
Wildtype vs. BCP + PC: $p<0.001$ PC vs. BCP + PC: $p<0.001$

Donc, aujourd'hui...

Les marqueurs "classiques" restent de mise

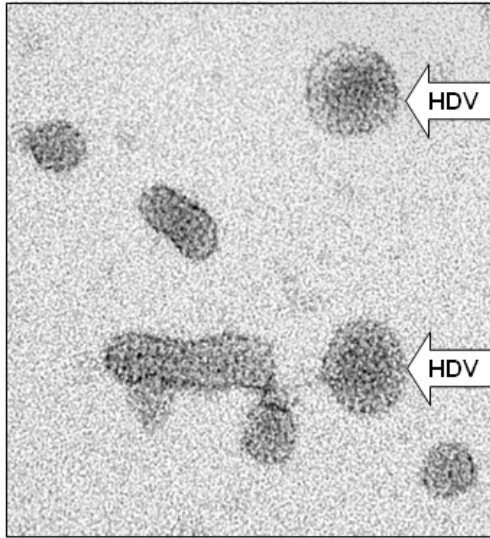
Quant aux nouveaux marqueurs :

✓ Il faudrait pouvoir les associer pour suivre les traitements

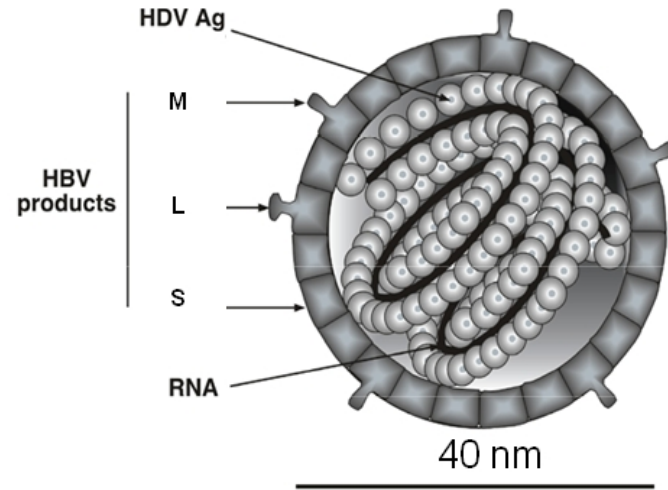
1. AgHBs : dosage des différentes isoformes (L, M), sensibilité accrue, mais perturbation par l'ADN intégré
2. HBcrAg : question de sensibilité et spécificité (AgHBe), difficile à utiliser en pratique
3. Q anti-HBc : données à confirmer
4. ARN : vers une standardisation
5. Standardisation du cccDNA en attente

Delta virus (HDV)

Virion structure



Gudima *et al.* (2007)



ICTV Report (2005)

Diagnostic

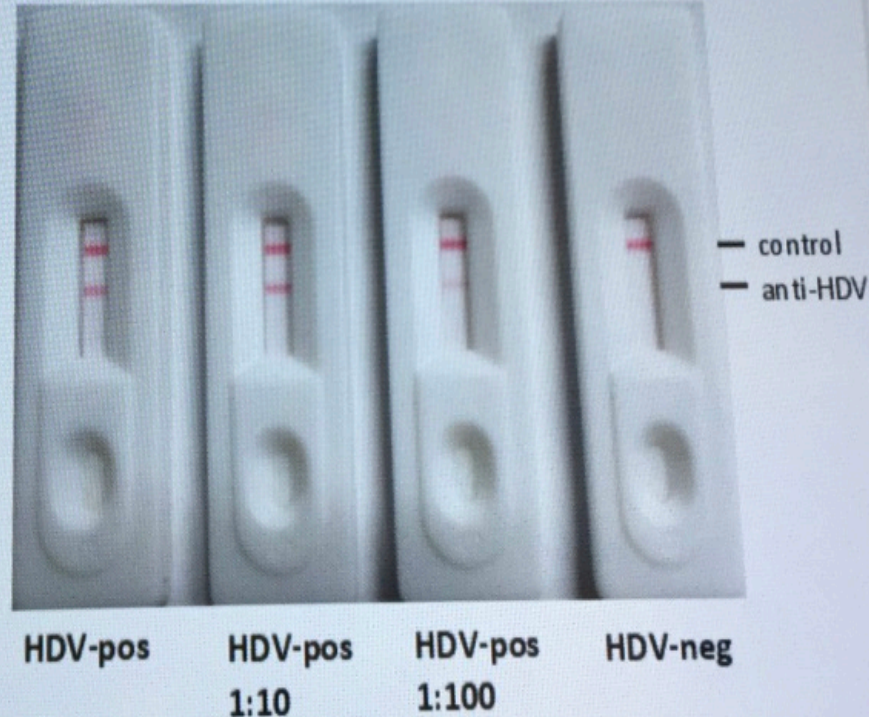
- Difficile en pays d'endémie ou les tests ne sont pas disponibles
- Guidelines: dépister au moins une fois les individus infectés par le VHB et en cas de réactivation
- Tests : Pas de changement en dehors de la mise au point récente de tests rapides et de la disponibilité de tests moléculaires commerciaux standardisés et fiables

Diagnosis : New rapid tests may be of interest for screening in rural places

3. A rapid lateral flow assay (LFA) for the detection of anti-HDV

Using the antigen described above, a rapid diagnostic test based on the lateral flow assay (LFA) technique was established.

Proof-of-principle studies showed that sera from HDV-infected patients led to a positive signal on the test strip even when diluted 1:100, while sera of HDV-negative patients did not lead to a positive test result.



Lempp F, Urban S. CA 2109; AASLD 2018

Diagnostic : tests moléculaires

ARN Delta : tests commerciaux standardisés de bonne qualité

- Ex : EurobioPlex HDV kit (Eurobio-Ingen, Les Ullis, France)
- CNR France (S Chevaliez, E Gordien) organise régulièrement des contrôles de qualité

Tests génériques (Omunis, Biocentric) en préparation

Merci!

