Nuevos marcadores para la manejo de la infección por Virus de la Hepatitis B

Juan Carlos Alados Arboledas
UGC Enfermedades Infecciosas y Microbiología
Hospital Universitario de Jerez. AGS Jerez, costa noroeste y sierra de Cádiz. INiBICA.

INiBICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN BIOMÉDICA DE CÁDIZ

Conflicto de intereses

- Gilead. Inscripción a Congresos. Ponente en reuniones organizadas por la compañía.
- Abbvie. Inscripción a Congresos. Ponente en reuniones organizadas por la compañía.
- Werfen. Inscripción a Congresos.
- MSD. Colaboración en actividades formativas

Objetivos

1. Revisión de los nuevos y viejos marcadores del virus de la hepatitis B.

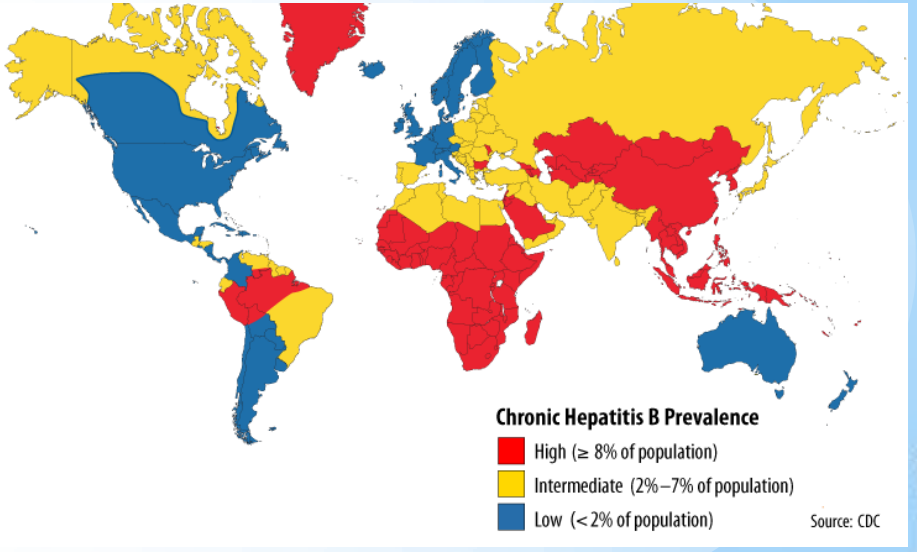
2. Posicionar los nuevos marcadores HBcrAg (antígenos relacionados con el core del virus de la hepatitis B) y ARN-VHC.

Contenidos

- Hepatitis B en el siglo XXI. Epidemiología.
- Microbiología del virus. Ciclo de vida.
- Historia natural de la infección
- Revisión de los nuevos y viejos marcadores del virus de la hepatitis B.
- Posicionar el nuevo marcador HBcrAg (antígenos relacionados con el core del virus de la hepatitis B) y ARN-VHC.

Hepatitis B en el siglo XXI. Epidemiología

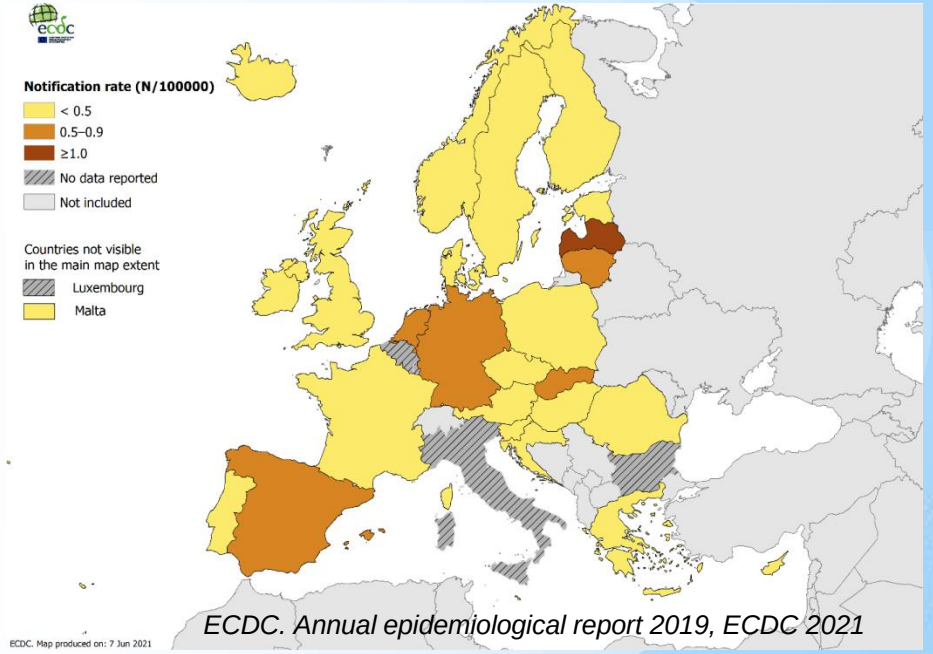
- 2 billones de personas con evidencia serológica de infección
- 300 millones infección crónica
- 900.000 muertes anuales
- Zonas epidemiológicas
  - Alta endemicidad (>8%): Este asiático y África subsa
  - Media (2-8%): Mediterráneo y Europa del Este
  - Baja (<2%): Norte américa y Europa Occidental
- Responsable de >50% de hepatocarcinoma mundo



Hepatitis B en el siglo XXI. Epidemiología

Informe ECDC 2019

- Europa: 4,7 millones personas infectadas por VHB
- 64.000 muertes relacionadas (VHB/VHC)*
- 7,4 casos/100.000 habitantes
- 6% Infección aguda; 48% I. crónica
- Relación hombre/mujer ➔1,5/1
- Trasmisión Infección crónica:
  - Vertical 36%; nosocomial 20%
- Transmisión Infección aguda:
  - heterosexual 27%; nosocomial 17%; HXH 13%, exposición no ocupacional 10%; relacionados inyección de drogas 10% .

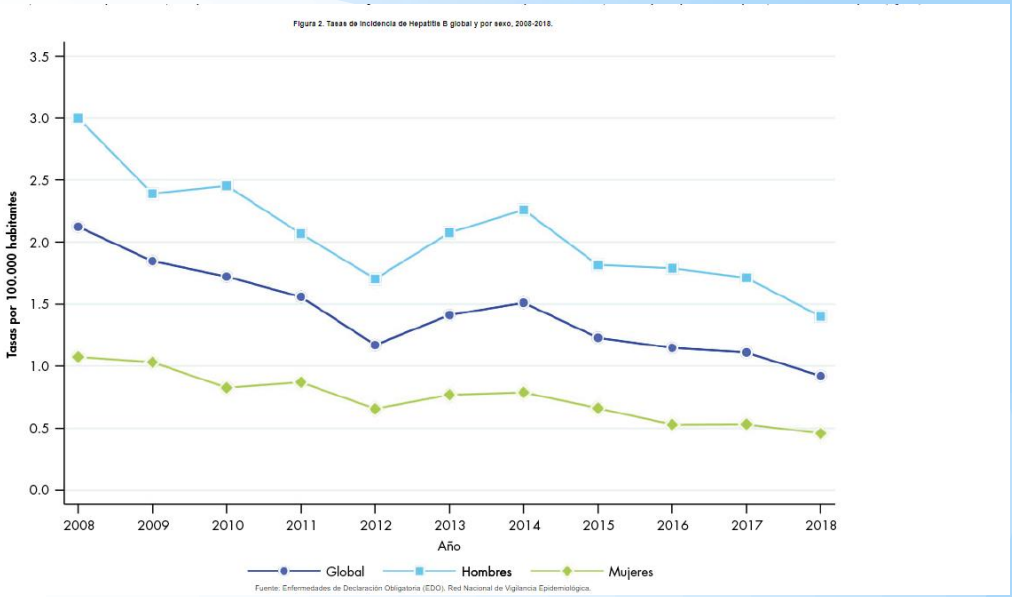


ECDC. Annual epidemiological report 2019, ECDC 2021

Hepatitis B en el siglo XXI. Epidemiología

Informe Instituto Carlos III (2008-2018)

- Descenso de tasa de Incidencia desde 2,12 a 0,92 casos/100.000 habitantes desde 2008
- Edad media pasa de 39,4 a 47,4 años
- Mayor tasa en hombre frente a mujer
- Baja endemicidad con prevalencia AgHBs(+) 0,5-0,8% (Datos consenso AEEH 2020)



Instituto Salud Carlos III,
http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/download/1092/1360

Hepatitis B en el siglo XXI. Epidemiología

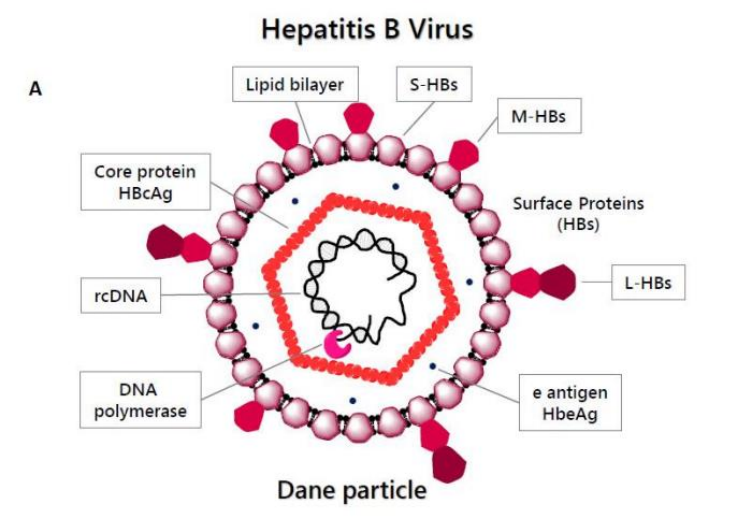
ATENCIÓN A CASOS IMPORTADOS

- En la UE en 2017 representaron el 15% del total de casos agudos

(hasta el 90% en países del norte de Europa).

Gonzalo Oliván-Gonzalvo *(Eimc 2021) estudiando menores inmigrantes destaca la alta prevalencia de infección actual por el VHB (14,8 %) entre los adolescentes subsaharianos.*

Microbiología del VHB



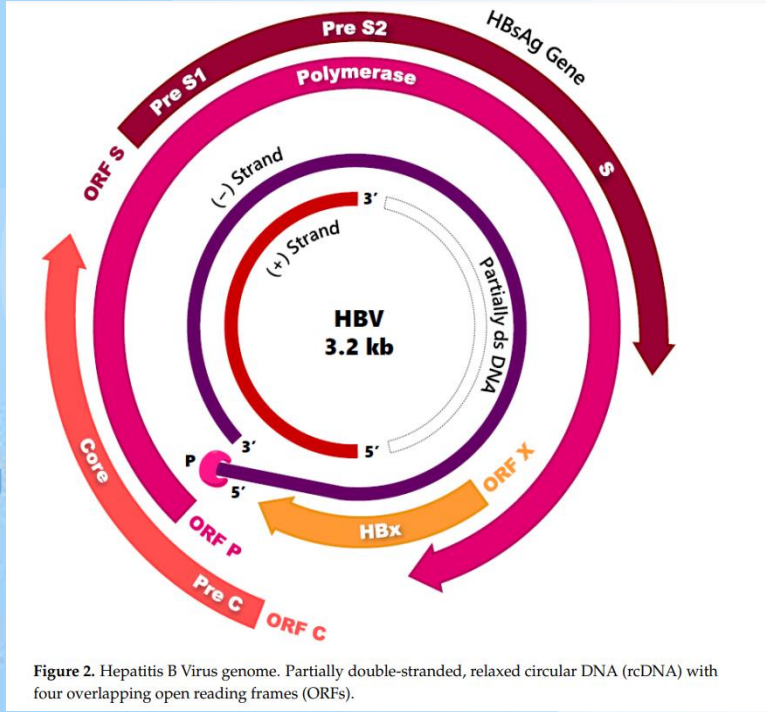
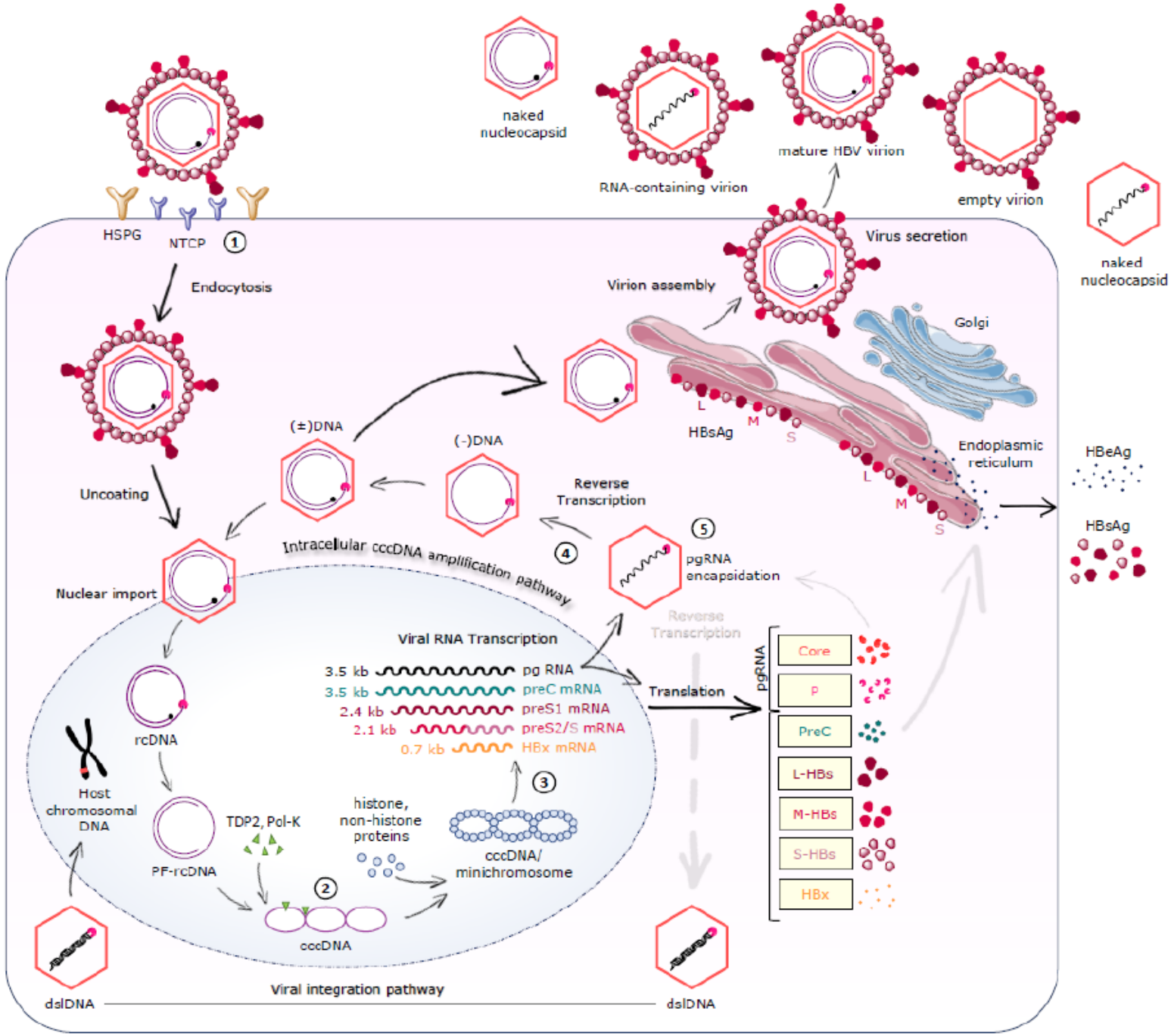


Figure 2. Hepatitis B Virus genome. Partially double-stranded, relaxed circular DNA (rcDNA) with four overlapping open reading frames (ORFs).

Tomado de Prifty et al. Pharmaceuticals, 2021

- Familia **hepadna**viridae
- ADN circular parcialmente de doble con cuatro zonas solapadas de lectura ORFs
- cccADN transcribe a
  - pregenómico 3.5 pgARN/preC➔
    - polimerasa, core (incluida AgHBe) y es molde para la replicación
  - subgenómico 2.4 kb, 2.1 kb y 0.7 kb➔
    - proteínas de envuelta (preS1, preS2, S) y proteína X.

Ciclo de vida



Tomado de Prifty et al. Pharmaceuticals, 2021

Futuros Antivirales

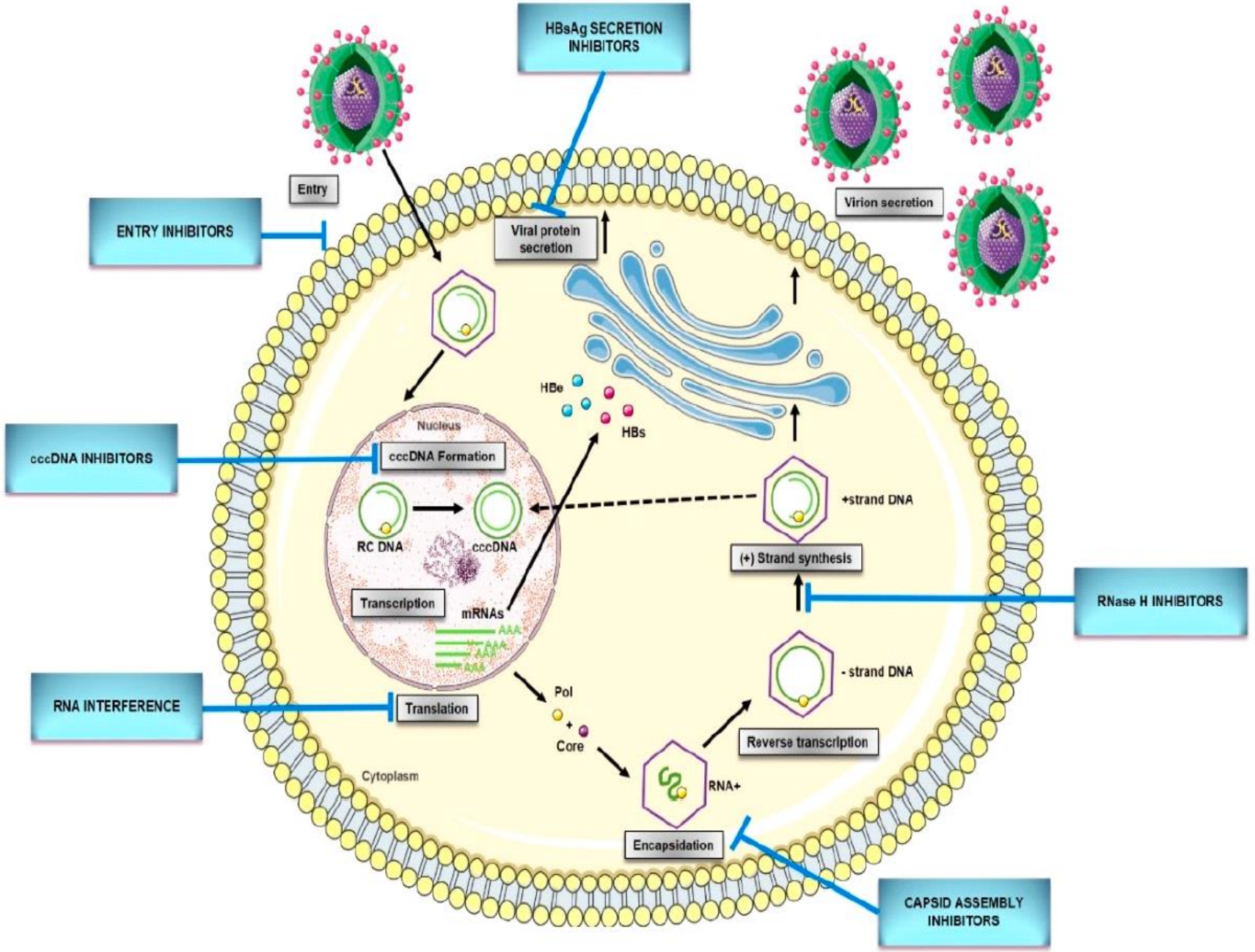


Figure 1. HBV replication cycle and new direct-acting antivirals for HBV. **Entry:** the replication cycle

Tomada de Ribicka y Bielawsky 2020

Historia natural de la infección

Tabla 1 Resumen de las principales características de las fases de la infección crónica por el virus de la hepatitis B

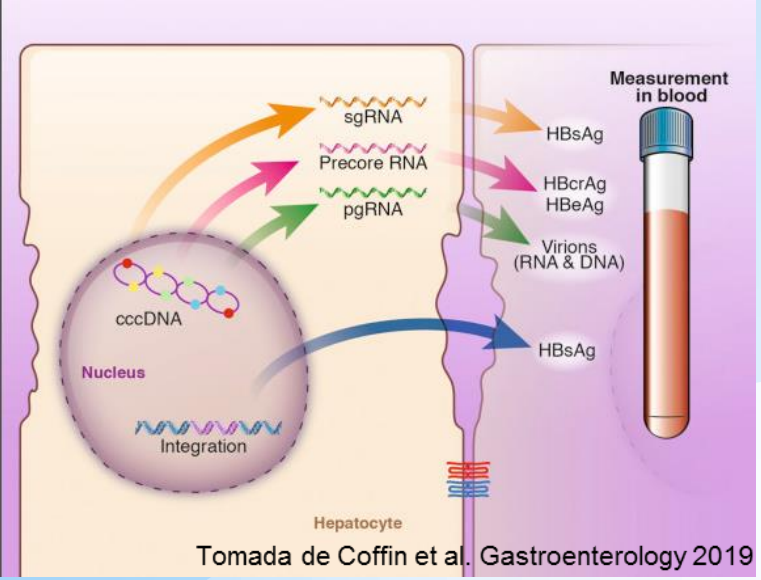
	HBeAg positivo		HBeAg negativo	
	Infección crónica	Hepatitis crónica	Infección crónica	Hepatitis crónica
Terminología previa	Inmunotolerante	Fase de inmunoactivación HBeAg+	Portador inactivo	Hepatitis crónica HBeAg negativo
qHBsAg (UI/mL)	Muy elevado	Elevado	Bajo[a]	Intermedio
ADN-VHB (UI/mL)	>10 millones	20.000-10 millones	< 2.000 (o < 20.000)[b]	>2.000 (o > 20.000)
ALT (UI/L)	Normal	Elevada	Normal	Elevada
Histología	Normal/cambios mínimos	Inflamación ± fibrosis	Normal	Inflamación ± fibrosis

[a] Generalmente <1.000 UI/mL.
[b] Algunos pacientes con infección crónica con HBeAg negativo presentan ALT persistentemente normal con nivel ADN-VHB entre 2.000-20.000 UI/mL y buen pronóstico a largo plazo.

Rodriguez et al. Gastroenterologia y Hepatologia, 2020

- **La respuesta inmune celular de los linfocitos T (CD4) se dirige principalmente a las proteínas del core, induciendo la estimulación de producción de AcHBc por parte de los linfocitos B.**
- **Las respuestas de inmunidad innata y adaptativa condicionaran que la infección cronifique o no**
- **Importante diferenciar Hepatitis crónica de Infección crónica**

Marcadores
Virus de la Hepatitis B



Tomada de Coffin et al. Gastroenterology 2019

- **Marcadores serológicos**
  - **HBs Ag cualitativo/cuant ©**
  - **HBs Ac ©**
  - HBc Ac (IgM/Total) ©
  - HBe Ag ©
  - HBe Ac ©
- **Marcadores moleculares**
  - ADN Carga viral ©
  - Genotipo y variantes (PC, PBC y Pol)

- **HBcr Ag (®Fujirebio)**
- **HBc Ac cuantitativo (Fujirebio®, Wantai)**
- **HBV-NRAg (Wantai)**

- **ADNccc intrahepático**
- **pgARN/ARN-VHB**

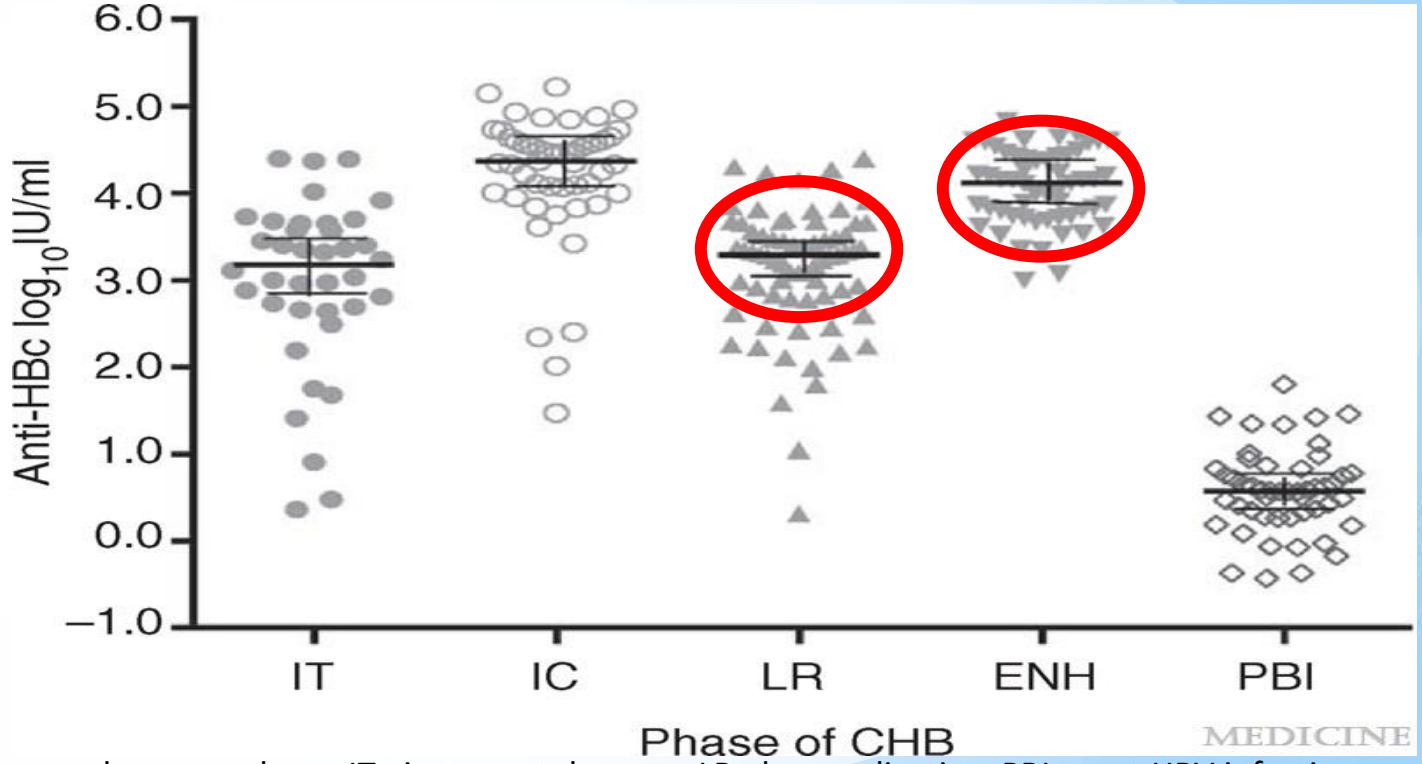
- Marcadores clásicos tienen limitaciones para predecir evolución clínica y respuesta al tratamiento.

Adaptada Aguilera A et al, Procedimientos SEIMC 2014

©Comercializados

Cuantificación AcHBc

- Marcador diagnóstico por excelencia
- Historia natural ➔ estadio de infección (4,3 log Hepatitis crónica *vs* 3,1 log infección crónica)



CHB = chronic hepatitis B, ENH = HBeAg-negative hepatitis, IC = immune clearance phase, IT = immune tolerance, LR = low replicative, PBI = past HBV infection

Jia et al . Medicine 2014

Cuantificación AcHBc

- Marcador diagnostico por excelencia
- Historia natural ➔ estadio de infección (4,3 log Hepatitis crónica *vs* 3,1 log infección crónica) *(Jia et al 2014)*
- Correlación con ALT durante tratamiento *(Li et al 2015)*
- Severidad daño hepático En pacientes con ALT normal

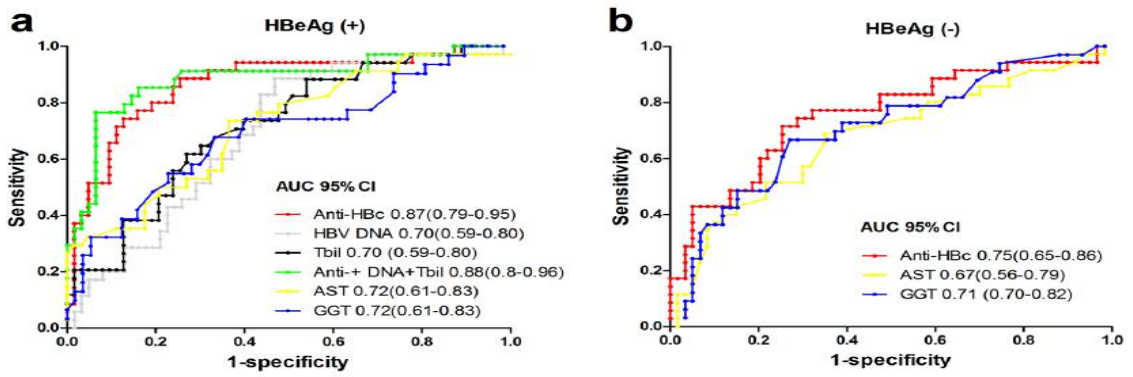
<4,6 log UI/ml➔ baja o moderada necro-inflamación *(Zhou et al 2017)*

Cuantificación AcHBc

- Marcador diagnostico por exceler
- Historia natural ➔ estadio de infe
  log infección crónica)
- Correlación con ALT durante trata
- Severidad daño hepático

En pacientes con ALT normal

<4,6 log UI/ml➔ baja o moderada necro-inflamación



	Anti-HBc Cutoff Value (log_{10}IU/ml)	Liver inflammation HAI < 5	Liver inflammation HAI≥5	Se (%)	Spe (%)	PPV (%)	NPV (%)	Correctly classified (%)
HBeAg (+)								
	> 4.47	10	27	77.14	84.13	72.97	86.89	81.63
	≤4.47	53	8					
	> 4.67	3	18	51.43	95.24	85.71	77.92	79.59
	≤4.67	60	17					
HBeAg (-)								
	> 4.47	16	22	62.86	73.33	57.89	77.19	69.47
	≤4.47	44	13					
	> 5.00	3	9	25.71	95	75	68.67	69.74
	≤5.00	57	26					

Figure 4. Serum anti-HBc holds a better diagnostic value for differentiating between mild or no (HAI < 5) and moderate-to-severe (HAI ≥ 5) in HBeAg (+) (a) and HBeAg (−) (b) patents with normal ALT. AUROC, area under receiver operating characteristics curve; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; AST, aspartate aminotransferase; Se, sensitivity; Spe, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Zhou J et al, Sci Rep, 2017

Cuantificación AcHBc

- Marcador diagnostico por excelencia
- Historia natural ➔ estadio de infección (4,3 log Hepatitis crónica *vs* 3,1 log infección crónica)
- Correlación con ALT durante tratamiento
- Severidad daño hepático (<4,6 log UI/ml➔ baja o moderada necro-inflamación)
- Reactivación (AcHBc ↑↑↑ y AcHBs ↓) *(Yang et al J Hepatol 2018)*
- Infección oculta menores títulos que “pasada” (*Caviglia et al, Diag Microb Infect Dis 2020*)

Cuantific[illegible]AcHBc

- Marcador diagnostico por excelencia
- Historia natural ➔ estadio de infecci[illegible] Hepatitis crónica *vs* 3,1 log infección crónica)
- Correlación con ALT durante[illegible]to
- Severidad daño hepáti[illegible] UI/ml➔ baja o moderada necro-inflamación)
- Reactivación ([illegible]↑ y AcHBs ↓) *(Yang et al J Hepatol 2018)*
- Infecció[illegible]enores títulos que “pasada” (*Caviglia et al, Diag Micr[illegible]bis 2020*)

Limitaciones: Rango dinámico, Proveedores y Falsos positivos

(Aguilera et al, SEIMC 2014)

Cuantificación AgHBs

- Marcador clásico para el diagnóstico de infección por VHB.
- Aclaramiento del AgHBs ➔ cura funcional
- Se genera a través del cccADN y del ADN integrado
- Estándar de la OMS

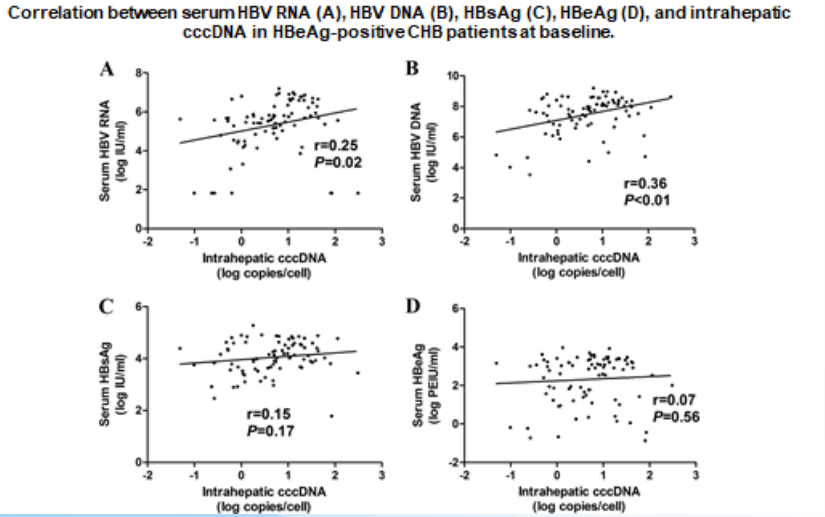
Vachon & Osiowy. Viruses 2021

Cuantificación AgHBs

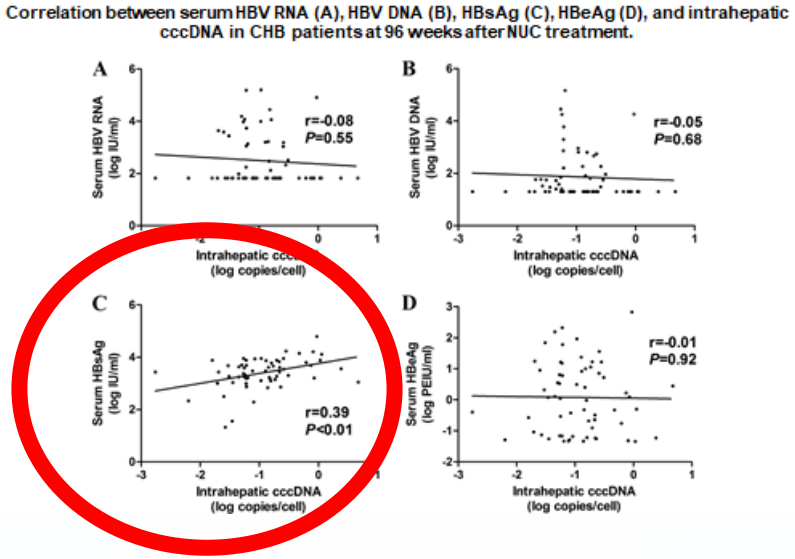
- Correlación con otros marcadores
  - En tratados: Buena correlación con DNA y RNA sérico (Wang 2020) (mejor en AgHBe+)
  - No tratados: AgHBs bajo asociado a baja replicación en AgHBe(-) (*Ungtrakul 2017*)
  - En tratados: Descenso AgHBs ➔ descenso cccADN ih (*Gao 2017*)

Cuantificación AgHBs

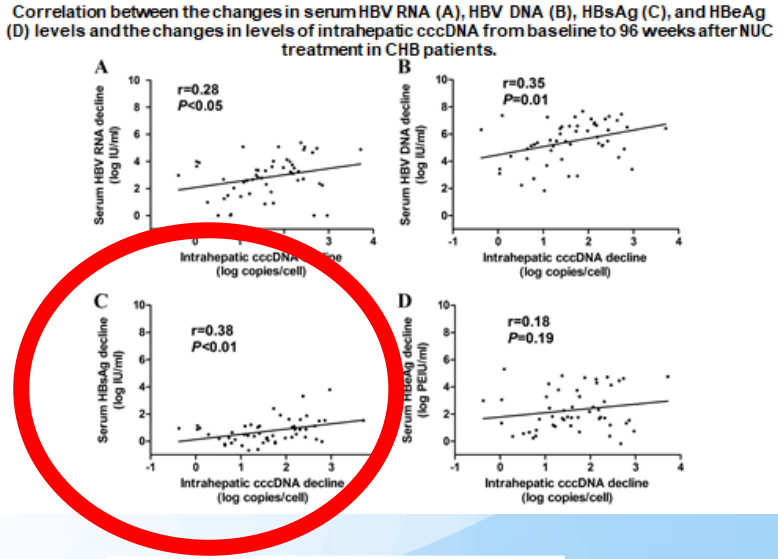
- Correlación con otros marcadores
  - En tratados: Buena correlación con DNA y RNA sérico (Wang 2020) (mejor en AgHBe+)
  - No tratados: AgHBs bajo asociado a baja replicación en AgHBe(-) (*Ungtrakul 2017*)
  - En tratados: Descenso AgHBs ➔ descenso cccADN ih (*Gao 2017*)



Basal



w96 tras tto

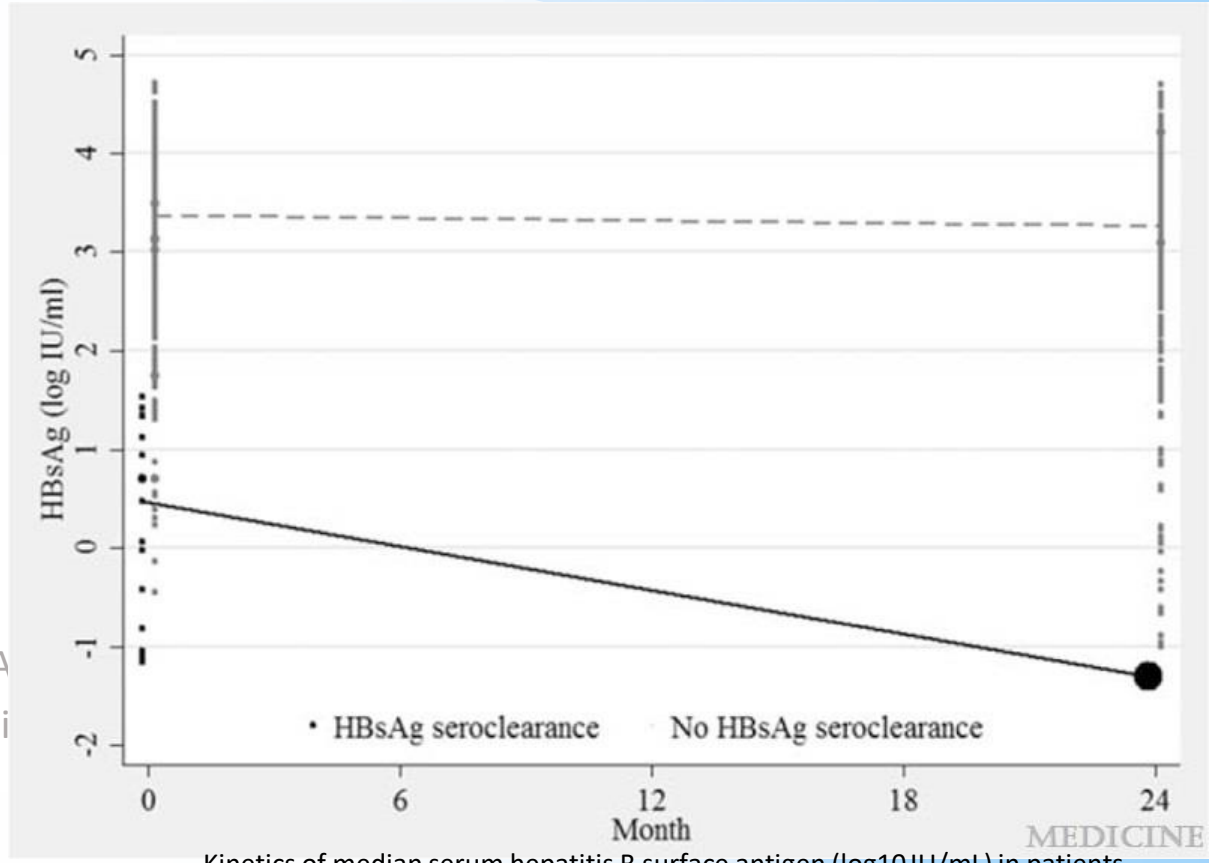


Descenso basal/w96

Yuhua Gao et al J Clin Microbiol 2017)

Cuantificación AgHBs

- Correlación con otros marcadores
- Diferenciar estadio enfermedad. Altos niveles en hepatitis crónica; <1000 UI/ml en infección crónica
- Respuesta al tratamiento y predicción de RVS
  - Niveles bajos pre tto y fuerte descenso inicial tras pegIFN (*Ungtrakul et al 2017*).
  - Composición basal AgHBs (bajos M-AgHBs y fuerte descenso M y L➔seroaclaramiento) (*Pfefferkorn et al, 2020*)
- Predicción de fibrosis y HCC
  - En AgHBe(-) naïve: niveles basales <3log AgHBs y >3,3 log A
  - Altos niveles AgHBs en naïve se asocian con agotamiento li
- Ultrasensible (0,2-5 mUI/ml)
  - Monitorizar reactivación
  - Niveles subclínicos tras aclaramiento AgHBs

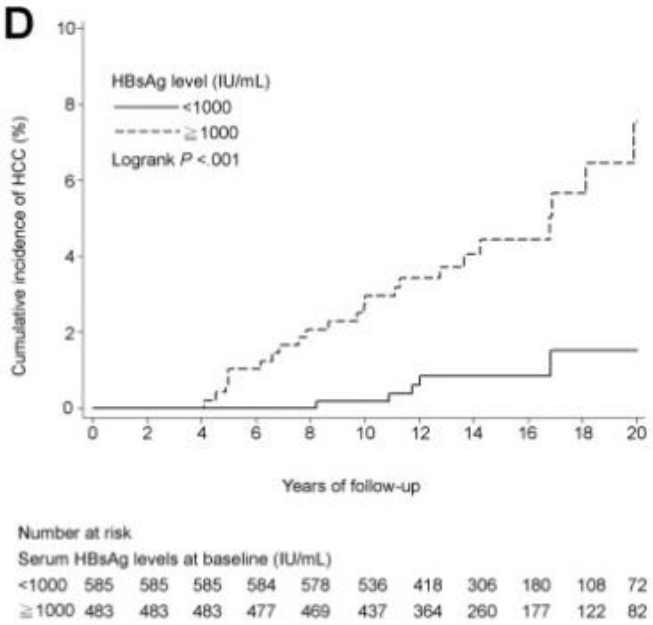


Kinetics of median serum hepatitis B surface antigen (log10 IU/mL) in patients who display hepatitis B surface antigen (HBsAg) seroclearance (black) and did not display HBsAg seroclearance (gray).

Ungtrakul et al Medicine96(13):e6554, March 2017.

Cuantificación AgHBs

- Correlación con otros marcadores
- Diferenciar estadio enfermedad. Altos niveles en hepatitis crónica
- Respuesta al tratamiento y predicción de RVS
- Predicción de fibrosis y HCC
  - En AgHBe(-) naïve: niveles basales <3log AgHBs y >3,3 log ADN➔ minimo riesgo de HCC (*Tseng et al 2012*)
  - Altos niveles AgHBs en naïve se asocian con agotamiento linfocitos T CD+4 y disfunción B (*Kim JH et al, 2020*)
- Ultrasensible (0,2-5 mUI/ml)
  - Monitorizar reactivación
  - Niveles subclínicos tras aclaramiento AgHBs



High Levels of Hepatitis B Surface Antigen Increase Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Low HBV Load.

Tseng et al. Gastroenterology 2012

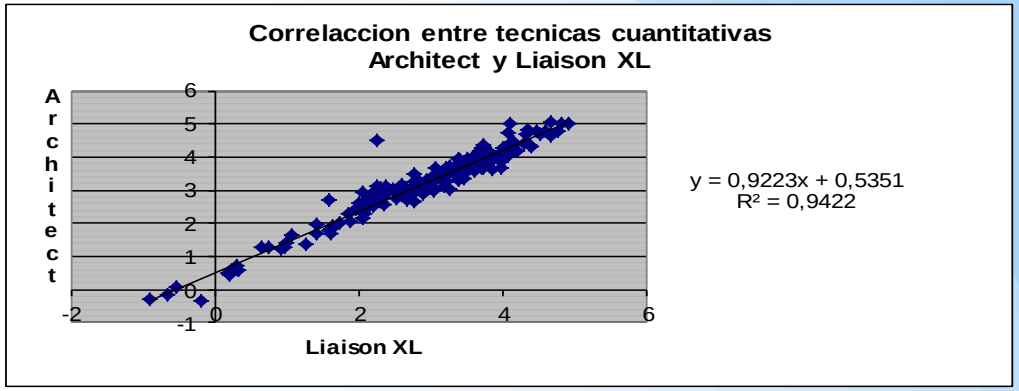
Cuantificación AgHBs

- Correlación con otros marcadores
- Diferenciar estadio enfermedad. Altos niveles en hepatitis crónica
- Respuesta al tratamiento y predicción de RVS
- Predicción de fibrosis y HCC
  - En AgHBe(-) naïve: niveles basales <3log AgHBs y >3,3 log ADN➔ minimo riesgo de HCC (Tseng et al 2012)
  - Altos niveles AgHBs en naïve se asocian con agotamiento linfocitos T CD+4 y disfunción B (Kim JH et al, 2020)
- Ensayo Ultrasensible (0,2-5 mUI/ml)
  - Monitorizar reactivación
  - Niveles subclínicos tras “aclaramiento” AgHBs

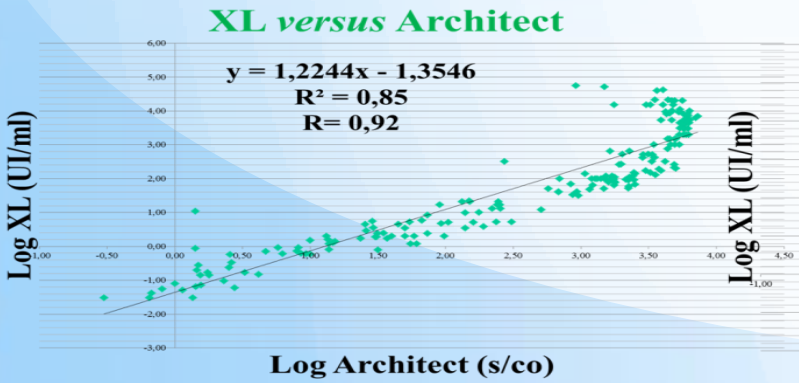
Cuantificación AgHBs.

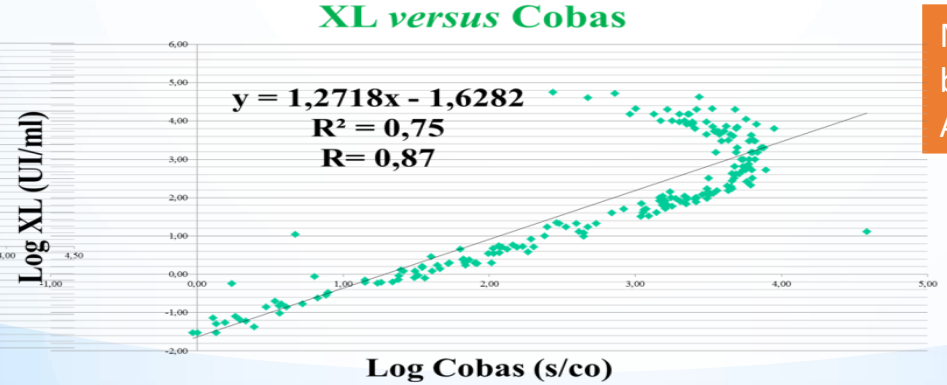
- Buena correlación entre técnicas cuantitativas

Log HBsAg (UI/ml)=1.27 x Log s/co (Cobas®) -1.62
Log HBsAg(UI/ml)=1.22 x Log s/co (Architect®)-1.35



- Buena correlación log (index s/co) *vs* log (UI/ml) ➔ fácil semicuantificación





Mejor correlación en rangos de concentración más bajos (Cobas® y Architect®: 0.917 y 0.944 en para AgHBS ≤10.000 y 0.97 y 0.96 para AgHBs≤1.000)

Alados JC et al, XX Congreso SEIMC (2016)

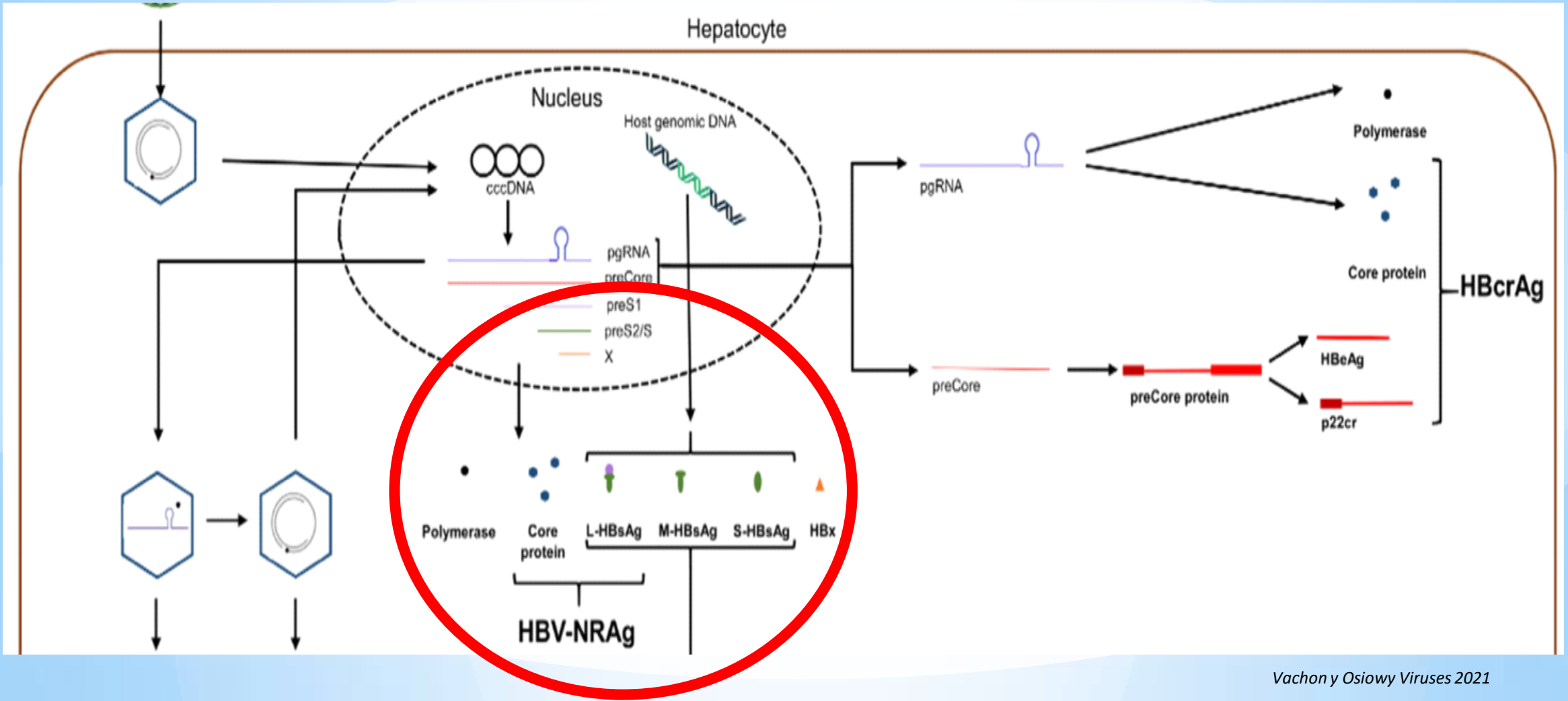
Cuantificación AgHBs. Documento AEEH 2020

- Su nivel refleja la cantidad y la actividad transcripcional del ADNccc (sobre todo en los pacientes con HBeAg+).
- Determinación mediante EIA
- Genotipo dependiente (más elevado en el genotipo A).
- En pacientes con HBeAg negativo no tratados, valores de qHBsAg <1.000 UI/ml junto a ADN-VHB <2.000 UI/ml, son indicativos de **infección crónica** (riesgo bajo de CHC) y cifras de qHBsAg < 100 UI/ml se asocian con la **pérdida espontánea** del HBsAg.
- En pacientes tratados con **IFN-PEG**, los niveles de qHBsAg a las 12 y 24 semanas de tratamiento tienen un elevado **valor predictor negativo** de respuesta, por lo que son útiles como reglas de parada.
- En pacientes tratados con **análogos de nucleós(t)idos** puede servir para estimar la duración necesaria del tratamiento para la cura funcional y, sobre todo, para **predecir la respuesta sostenida** tras la suspensión del tratamiento. Aunque todavía no se ha establecido un valor de corte, un nivel **<100 UI/ml** parece predecir dicha respuesta sostenida.
- En los tratamientos futuros dirigidos a conseguir la curación funcional de la infección por VHB será esencial monitorizar el nivel de qHBsAg.

Rodriguez et al. Gastroenterologia y Hepatologia, 2020

AGS Jerez, costa noroeste y sierra de Cádiz

Antígenos relacionados con AN-VHB



Vachon y Osiowy Viruses 2021

Antígenos relacionados con AN-VHB

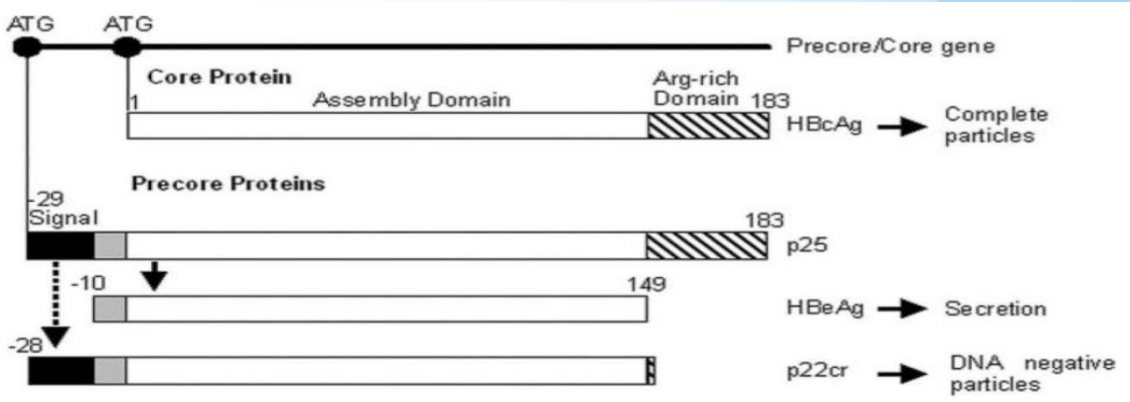
- Marcador subrogado de la actividad cccADN y replicación del VHB (Ag preS1) (*Muriungi et al 2020*).
- Detección de ADN residual sérico (*Buffello et al 2020*)
- Mejor correlación con ADN que los antigenos clásicos AgHBs y AgHBe (*Huang et al 2007*)
- Diferenciación entre infección crónica activa e inactiva (*Pfefferkorn 2018*)
- Se asocia a mayores tasas de disfunción hepática (*Zhang 2008*)

Utilidad si no acceso a Carga Viral VHB

Cuantificación AgHBcr

- Cuantifica simultáneamente (secuencia 149aa común)
  - Ag HBe desnaturalizado (72%)
  - Ag HBc (aprox 15%)
  - proteina precore 22cr (aprox 15%)

~



Kimura T et al, J Clin Microbiol 2002

- Lumipulse G HBcrAg assay® (Fujirebio) (CLEIA)
  - Cuantificación U/ml (1 U/ml=10 fg/ml HBeAg)
  - Rango cuantificación 3-7 log U/ml (2,1 log U/ml iTAC-HBcrAg®)
  - Umbral de detección 2 log U/ml

Cuantificación AgHBcr

- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral ➔ la actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de recaida tras tto
- Reactivación por inmunosupresión

Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Yi M. Gut and Liver, 2019

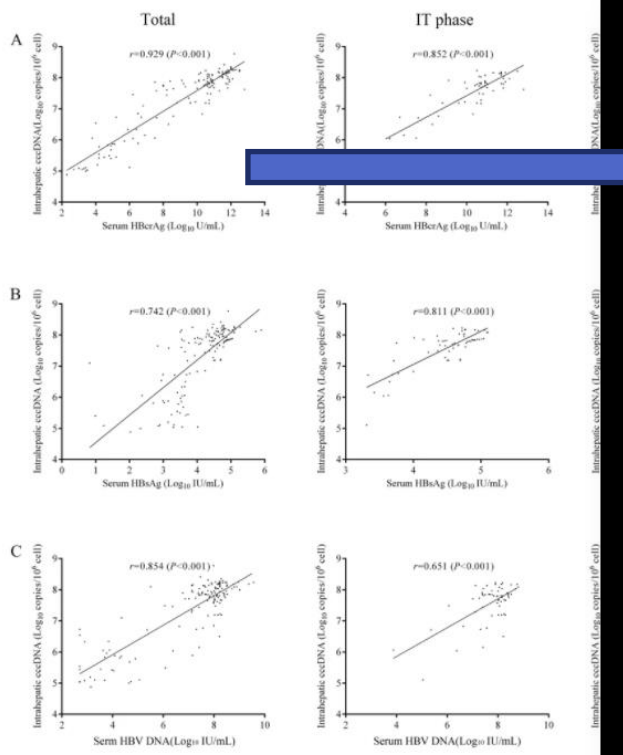
AGS Jerez, costa noroeste y sierra de Cádiz

Cuantificación AgHBcr

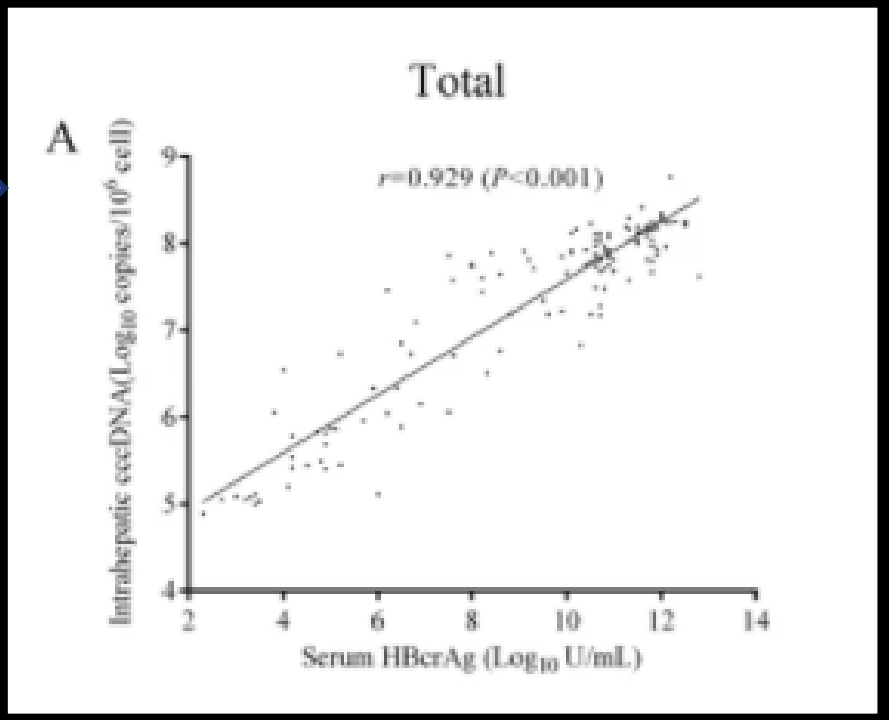
- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que ADN, pgARN y HBsAg

Figure 3

From: Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrog



The correlations of serum qHBcrAg (**A**), qHBsAg (**B**) and HBV DNA (**C**) with intrahepatic cccDNA among different phases of CHB.

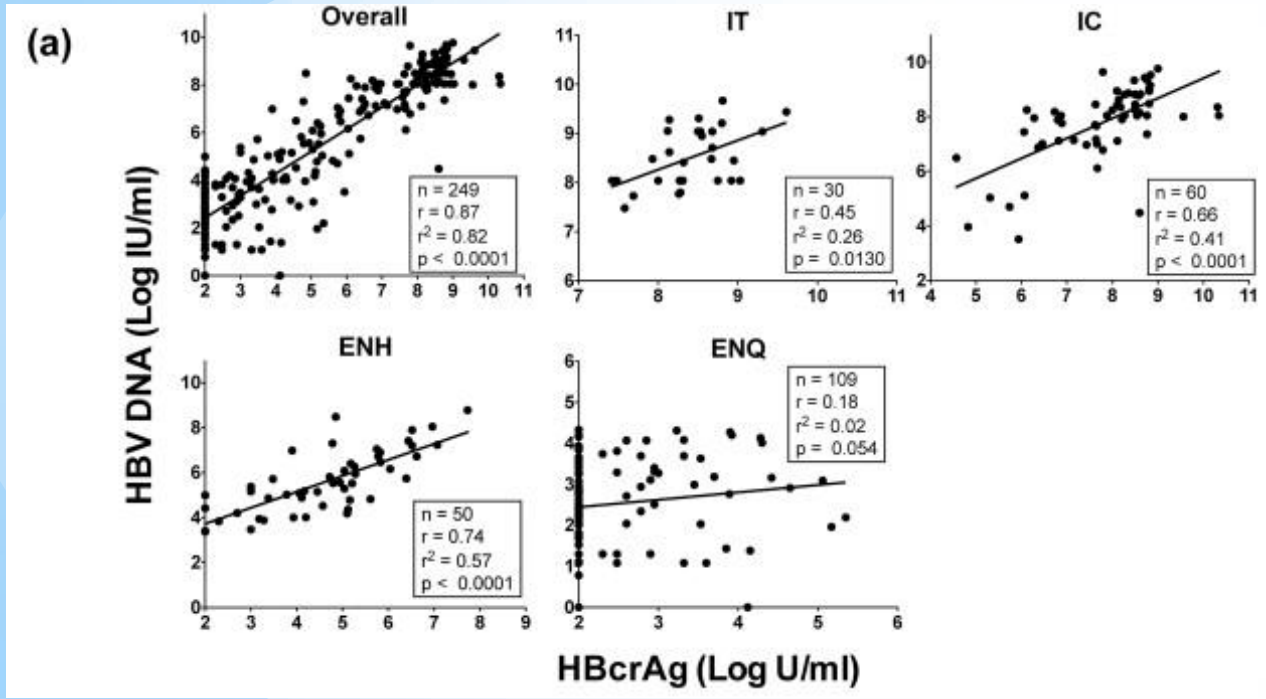


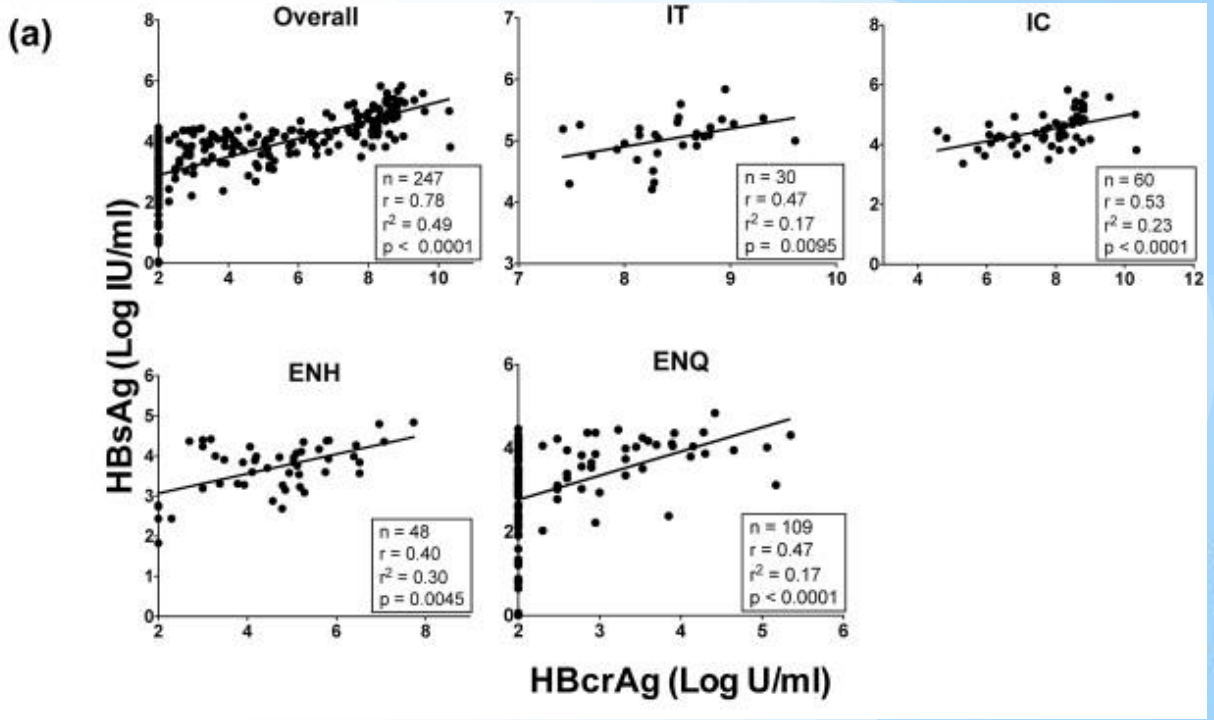
Chen et al. Sci Rep 2017

AGS Jerez, costa noroeste y sierra de Cádiz

Cuantificación AgHBcr

- Buena correlación Ag HBcr vs CVVHC y moderada vs Ag HBs





Maasoumy et al, Clin Microbiol Infect 2015

Cuantificación AgHBcr

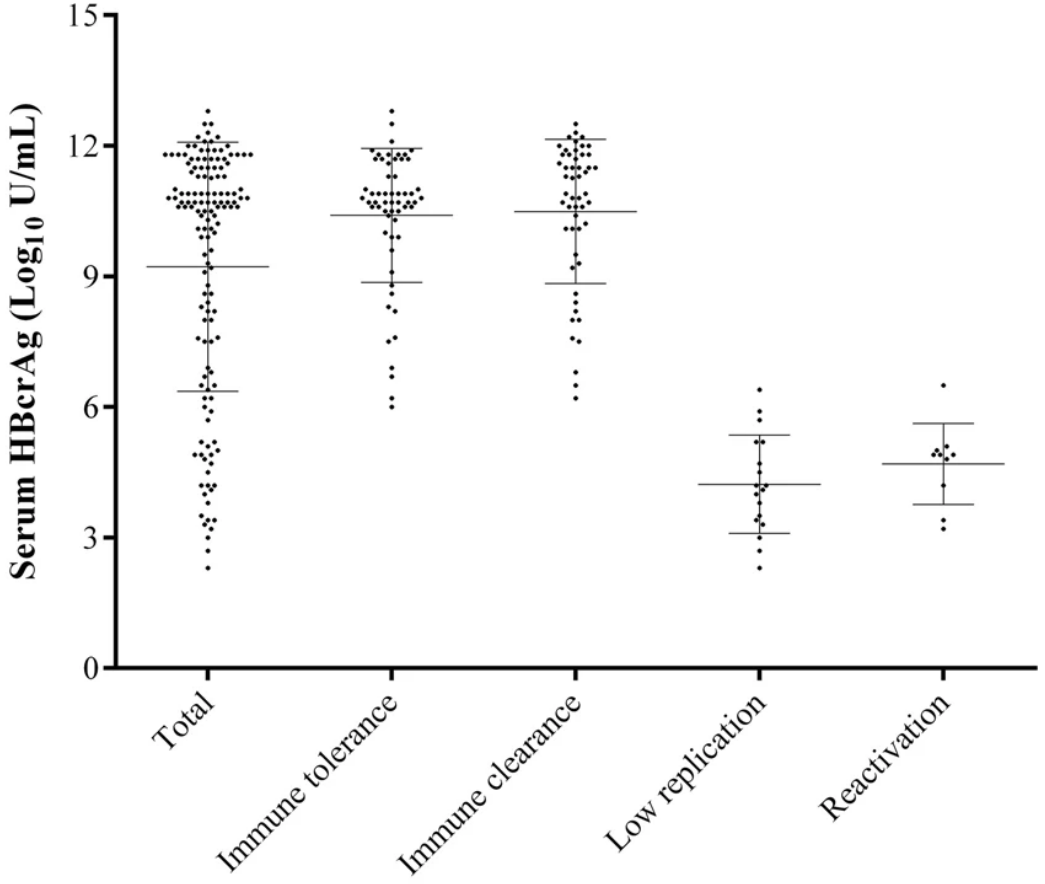
- Historia natural

  descenso ➔
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs

Figure 1

Sci Rep **7,** 173 (2017).

From: Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B



Chen et al Sci Rep 2017

Cuantificación AgHBcr

- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que con ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral ➔ actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir ausencia de respuesta pgIFN (↓ <0,5 log U/ml)
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de recaida tras tto
- Reactivación por inmunosupresión

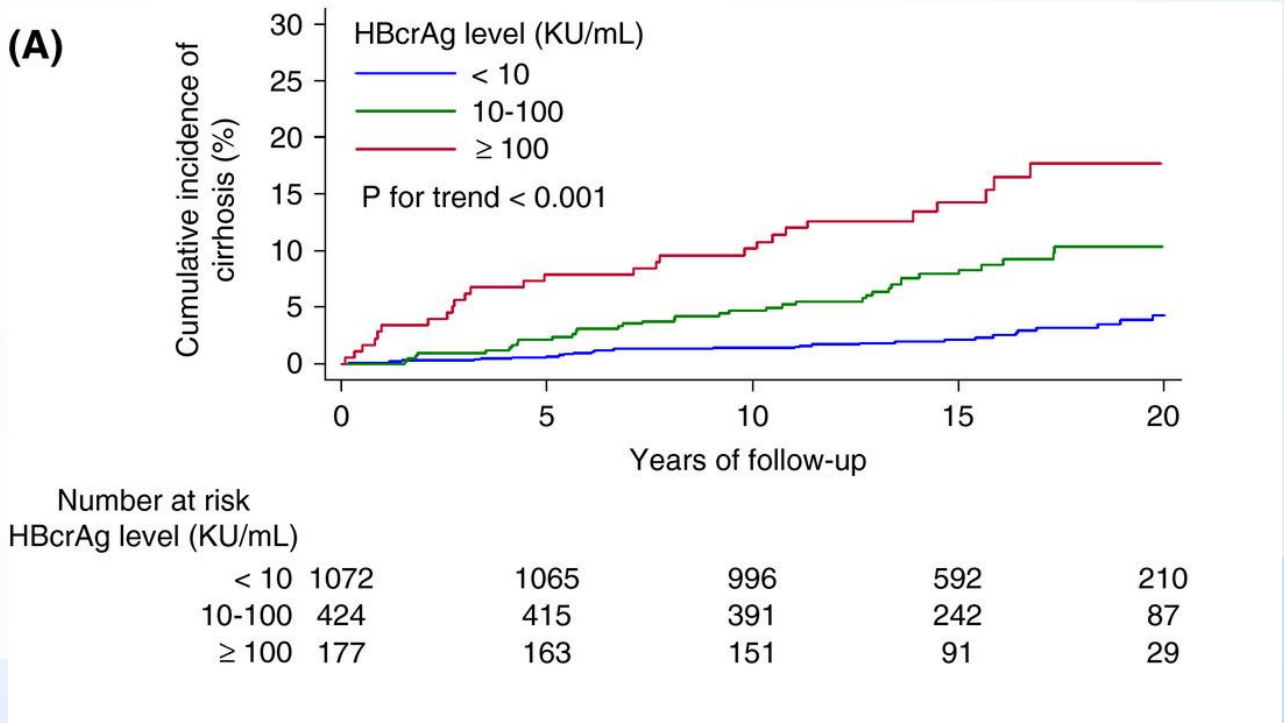
Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Y et al. Gut and Liver, 2019

Cuantificación AgHBcr

AP&T Alimentary Pharmacology & Therapeutics WILEY

Serum hepatitis B core-related antigen level stratifies risk of disease progression in chronic hepatitis B patients with intermediate viral load

Tai-Chung Tseng[1,2,3] | Chun-Jen Liu[1,2,4] | Wan-Ting Yang[2] | Chen-Yang Hsu[5] |



Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels stratified the risk of cirrhosis (A) in the overall cohort (Tseng et al 2021)

Cuantificación AgHBcr

- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que con ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral ➔ actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de recaida tras tto
- Reactivación por inmunosupresión

Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Y et al. Gut and Liver, 2019

Research Article
Viral Hepatitis

JOURNAL
OF HEPATOLOGY

Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients

Barbara Testoni[1,2,†], Fanny Lebossé[1,2,3,†], Caroline Scholtes[1,2,4], Françoise Berby[1], Clothilde Miaglia[1,2,3], Miroslava Subic[3], Alessandro Loglio[5], Floriana Facchetti[5], Pietro Lampertico[5], Massimo Levrero[1,2,3,6], Fabien Zoulim[1,2,3,*]

Actividad transcripcional

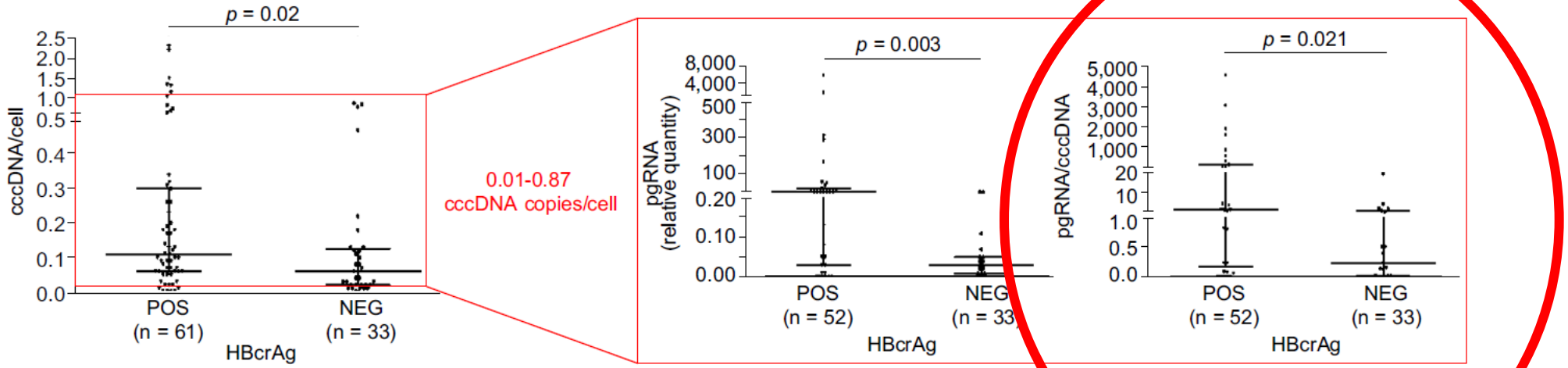


Fig. 2. HBcrAg+ HBeAg– patients show higher cccDNA transcriptional activity than HBcrAg– HBeAg– patients. Dot plots of pgRNA and cccDNA transcriptional activity (pgRNA/cccDNA ratio) levels in HBcrAg+ *vs.* HBcrAg– in 85 HBeAg– patients with cccDNA quantity between 0.01 and 0.87 copies/cell. Lines indicate median with interquartile range. Mann-Whitney *U* test was used to compare HBcrAg+ and HBcrAg– groups, α threshold = 0.05. cccDNA, covalently closed circular DNA; HBcrAg, hepatitis B core-related antigen; HBeAg, hepatitis B e antigen; pgRNA, pregenomic RNA. (This figure appears in colour on the web.)

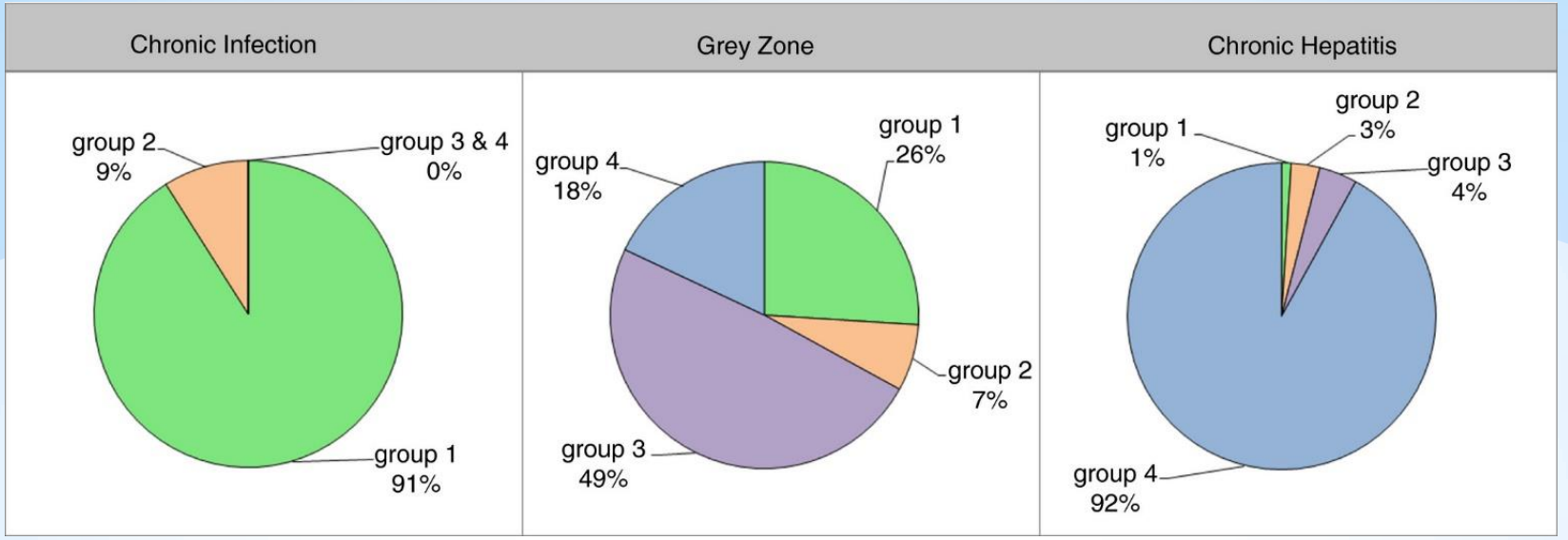
Cuantificación AgHBcr

- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que con ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral ➔ actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir ausencia de respuesta pgIFN (↓ <0,5 log U/ml)
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de recaida tras tto
- Reactivación por inmunosupresión

Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Y et al. Gut and Liver, 2019

Incremental value of HBcrAg to classify 1582 HBeAg-negative individuals in chronic infection without liver disease or hepatitis

Brunetto et al. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, Volume: 53, Issue: 6, Pages: 733-744, First published: 19 January 2021, DOI: (10.1111/apt.16258)



Distribution of the different combination of HBV-DNA (≤ or >2000 IU/mL) and HBcrAg (< or ≥3 logU/mL) in the three clinical categories.

Green: group 1 (HBV-DNA ≤2000 IU/mL and HBcrAg <3 logU/mL), 91%, 26% and 1% in chronic infection, Grey Zone grey-zone (HBV-DNA <20 000 IU/mL) and chronic hepatitis respectively;

Salmon: group 2 (HBV-DNA ≤2000 IU/mL and HBcrAg ≥3 logU/mL), 9%, 7% and 3% in chronic infection, Grey Zone and chronic hepatitis respectively;

Violet: group 3 (HBV-DNA >2000 IU/mL and HBcrAg <3 logU/mL), 0%, 49% and 4% in chronic infection, Grey Zone and chronic hepatitis respectively;

Light Blue: group 4 (HBV-DNA >2000 IU/mL and HBcrAg ≥3 logU/mL), 0%, 18% and 92% in chronic infection, Grey Zone and chronic hepatitis respectively

Conclusión: La prueba AgHBcr mostró un alto rendimiento diagnostico en la identificación de pacientes con hepatitis crónica AgHBe(-) con una sola determinación (>3 log U/ml).

Cuantificación AgHBcr

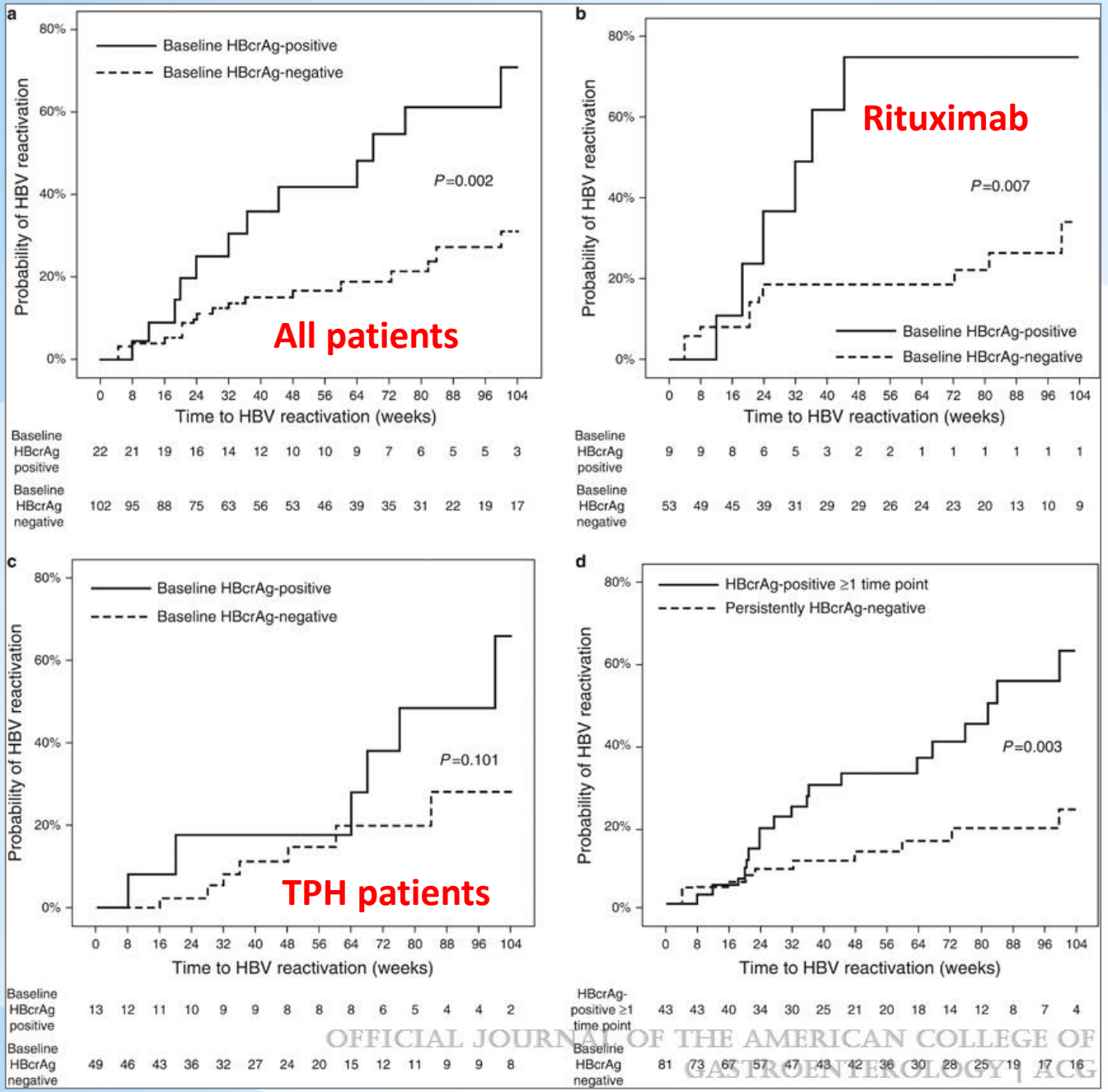
- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que con ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral puesto que refleja la actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir ausencia de respuesta pgIFN (↓ <0,5 log U/ml)
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de reactivación tras tto relacionado con niveles AgHBcr fin de tto
- Reactivación por inmunosupresión

Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Y et al. Gut and Liver, 2019

Cuantificación AgHBcr

- HBcrAg tiene una mejor correlación con cccADN que con ADN, pgARN y HBsAg
- Historia natural
  - Seroconversión AgHBe
  - Seroaclaramiento AgHBs
- altos niveles de AgHBcr con mayor grado de fibrosis, cirrosis e inflamación hepática
- marcador de replicación viral puesto que refleja la actividad transcripcional cccADN
- Identificación de enfermedad activa/ inactiva (junto a Carga viral ADN)
- Monitorizacion tto
  - Predecir ausencia de respuesta pgIFN (↓ <0,5 log U/ml)
  - Predecir seroconversión AgHBe en pacientes tratados AN
  - Predecir perdida de AgHBs y respuesta viral sostenida
  - Riesgo de recaida tras tto
- Reactivación por inmunosupresión

Vachon & Osiowy. Viruses 2021.
Lung Y et al. Gut and Liver, 2019



Cumulative rate of hepatitis B virus (HBV) reactivation of all patients as **stratified by baseline hepatitis B core-related antigen (HbcrAg) positivity** for all patients (a), rituximab-containing chemotherapy (b), hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (c), and HBcrAg positivity at ≥1 time point for all patients (d).

Seto, el al . Official journal of the American College of Gastroenterology 2016

OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF GASTROENTEROLOGY | ACG

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. and/or its subsidiaries. All rights reserved.

Table 1. Clinical applications of HBcrAg in CHB patients

Category	Finding	HBcrAg level (log U/mL) and point	References
Natural history	HBeAg seroconversion	<4.92 log U/mL during the clinical course	Seto et al, 2014
	HBsAg seroclearance	Undetectable (79%), 2.7 log U/mL (median of 21%) during the clinical course	Seto et al, 2012
cccDNA activity	Lower amounts of intrahepatic cccDNA and lower cccDNA activity	<3 log U/mL	Testoni et al, 2019
	Identification of inactive carriers with a high accuracy (any HBV genotype)	HBcrAg ≤3 log U/mL plus HBV DNA ≤2,000 IU/mL	Riveiro-Barciela et al, 2017
Anti-HBV treatment	HBeAg seroconversion by PEG-IFN at 12 weeks	>8 log U/mL (no response) at the beginning of therapy	Chuaypen et al, 2016
	HBeAg seroconversion by PEG-IFN plus NA for 4 weeks followed by PEG-IFN for 20 weeks	>4.5 log U/mL (no response) at the beginning of therapy	Matsumoto et al, 2015
	No LAM resistance	<4.6 log U/mL at 6 months of treatment	Tanaka et al, 2006
	Virological relapse within 1 year of NA cessation	>3.7 log U/mL at NA cessation	Jung et al, 2016
	Virological relapse regardless of undetectable HBV DNA for at least 6 months	3.2-3.7 log U/mL at NA (LAM or ETV) cessation	Shinkai et al, 2006
HCC occurrence/recurrence	At high risk for HCC with intermediate viral load (HBV DNA 2,000-19,999 U/mL)	≥4.0 log U/mL	Tseng et al, 2021
	Cumulative incidence of HCC during NA treatment	≥3.4 log U/mL at the time of HBV DNA disappearance	Jung et al, 2016
	HCC development during NA treatment	Detectable HBcrAg during NA treatment	Honda et al, 2016
	Long-term effect of NA treatment on HCC progression	Higher serum levels of HBcrAg and BCP mutations were associated with progression to HCC, independent of NA therapy	Kumada et al, 2013
	Evaluation of HCC occurrence	HBcrAg >3.0 log U/mL and HBsAg >3.0 log IU/mL (cut-off values)	Suzuki et al, 2019
	Incidence of HCC for treatment-experienced patients	>4.67 log U/mL at pre-treatment, >3.89 log U/mL at post-treatment	Cheung et al, 2017
	HCC development during NA treatment	Detectable HBcrAg during NA treatment	Honda et al, 2016
	Incidence of HCC for treatment-naïve patients	>2.9 log U/mL during follow-up period	Hosaka et al, 2019
	HCC recurrence within 2 years	>4.8 log U/mL at time of HCC diagnosis	Tada et al, 2016
HBV reactivation	HBV reactivation by high-risk immunosuppressive therapy within 2 years	Detectable HBcrAg at baseline	Seto et al, 2016
HBV reinfection	High levels of post-liver transplantation cccDNA	>4 log U/mL before liver transplantation	Yasunaka et al, 2011

Adaptada de Inoue y Tanaka 2020

Table 1. Clinical applications of HBcrAg in CHB patients

Category	Finding	HBcrAg level (log U/mL) and point	References
Natural history	HBeAg seroconversion	<4.92 log U/mL during the clinical course	Seto et al, 2014
	HBsAg seroclearance	Undetectable (79%), 2.7 log U/mL (median of 21%) during the clinical course	Seto et al, 2012
cccDNA activity	Lower amounts … NA and lower cccDN…	<3 log U/mL	Testoni et al, 2019
	Identificatio… …igh accuracy	HBcrAg ≤3 log U/mL plus HBV DNA ≤2,000 IU/mL	Riveiro-Barciela et al, 2017
Anti-HBV treatment	HBeAg s… …ks	>8 log U/mL (no response) at the beginning of therapy	Chuaypen et al, 2016
	HBe…	>4.5 log U/mL (no response) at the beginning of therapy	Matsumoto et al, 2015
		…log U/mL at 6 months of treatment	Tanaka et al, 2006
		…g U/mL at NA cessation	Jung et al, 2016
		…g U/mL at NA (LAM or ETV) cessation	Shinkai et al, 2006
HCC occurrence/recu…		…L	Tseng et al, 2021
		…the time of HBV DNA	Jung et al, 2016
		…ring NA treatment	Honda et al, 2016
		…BcrAg and BCP …iated with progression …A therapy	Kumada et al, 2013
		… HBsAg …lues)	Suzuki et al, 2019
		…tment, …eatment	Cheung et al, 2017
		…NA treatment	Honda et al, 2016
		…v-up period	Hosaka et al, 2019
		…CC diagnosis	Tada et al, 2016
HBV reactivation	HBV reactivation by high-risk immunosuppressive therapy within 2 years	Detectable HBcrAg at baseline	Seto et al, 2016
HBV reinfection	High levels of post-liver transplantation cccDNA	>4 log U/mL before liver transplantation	Yasunaka et al, 2011

Precaución

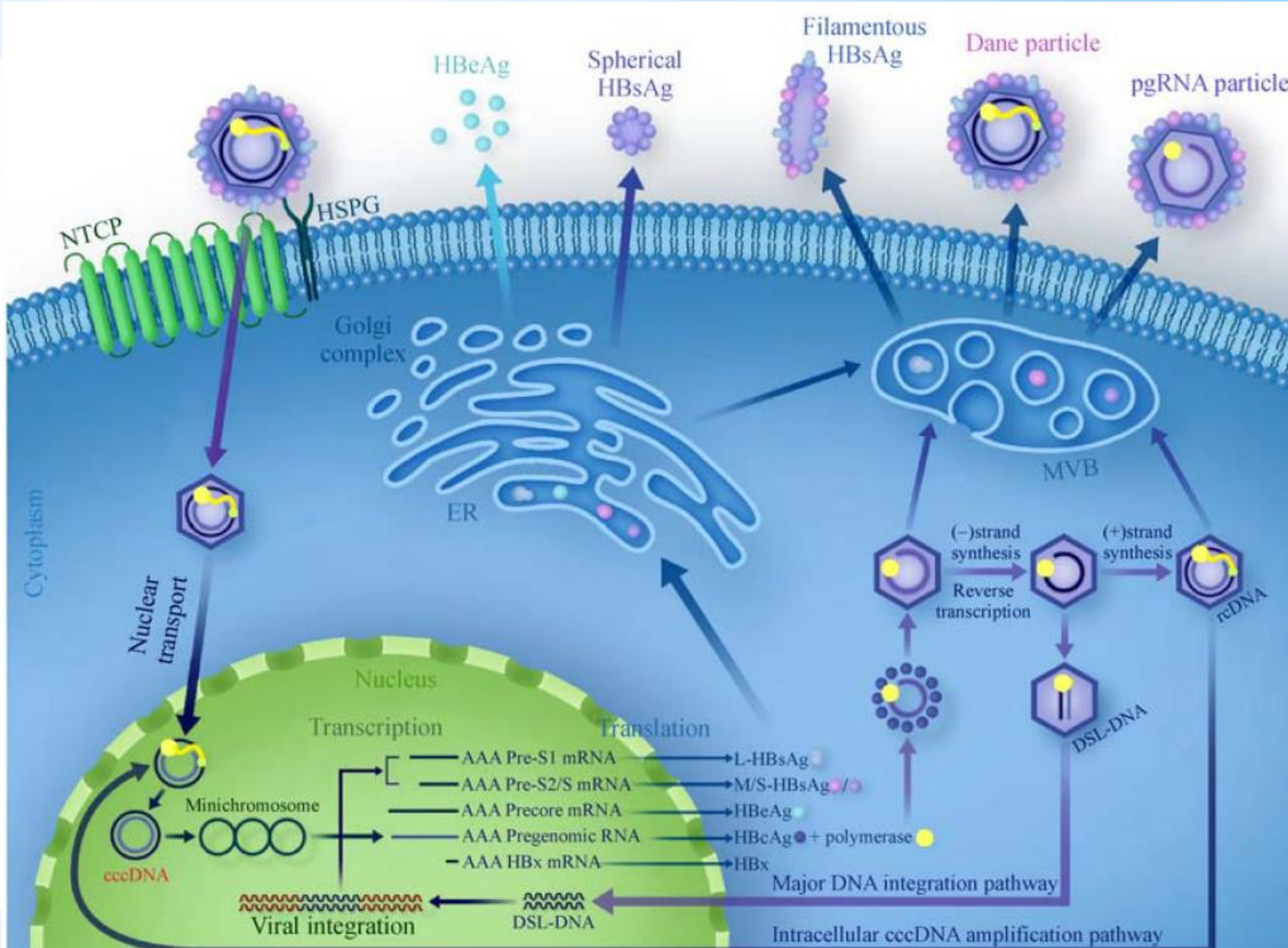
- mayoría de los estudios son asiáticos

- la prueba de AgHBcr sérico requiere más estudios de validación.

Adaptada de Inoue y Tanaka 2020

AGS Jerez, costa noroeste y sierra de Cádiz

Cuantificación ARN-VHB



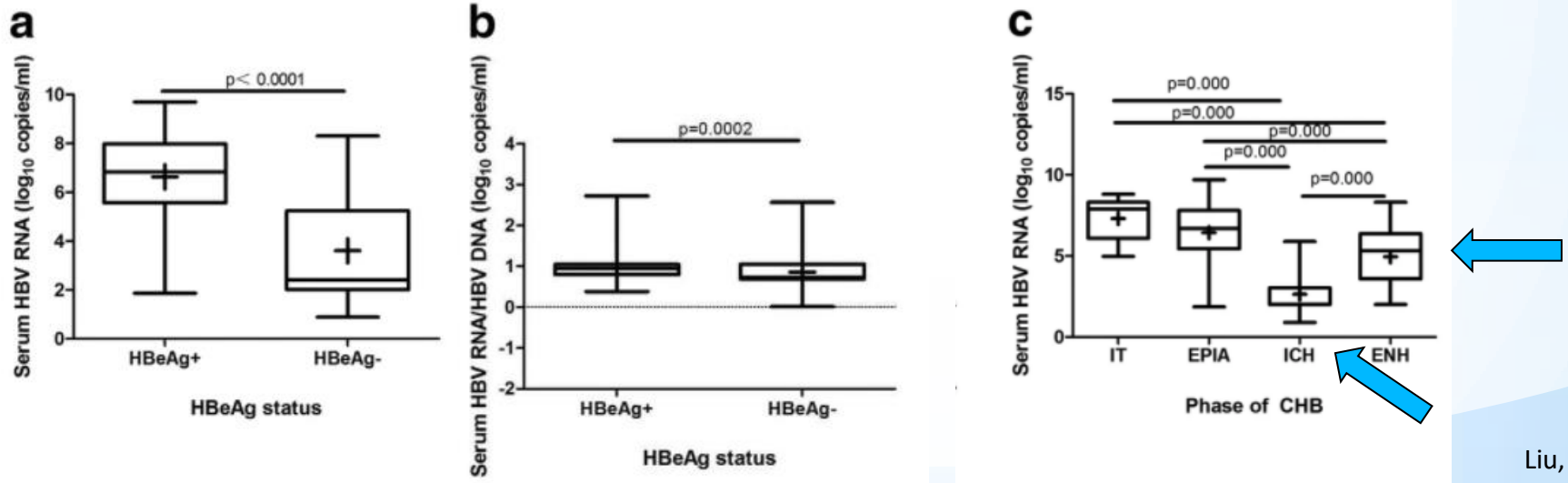
Fengmin Lu et al, Frontiers of Medicine 2017

Cuantificación ARN-VHB

- Potencial para discriminar fases de infección
  - RNA sérico y Ratio ARN sérico/ADN es mayor en infección crónica AgHBe(+) que en AgHBe(-) (Wang 2016, Liu 2019)
  - ARN menor en infección crónica *vs* hepatitis crónica en pacientes AgHBe (-) (Liu 2019)
- Buena correlacion con ADN sérico*. Tambien con AgHBcr, menor con AgHBs (Mak el al 2020)

Fig. 1

From: Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection

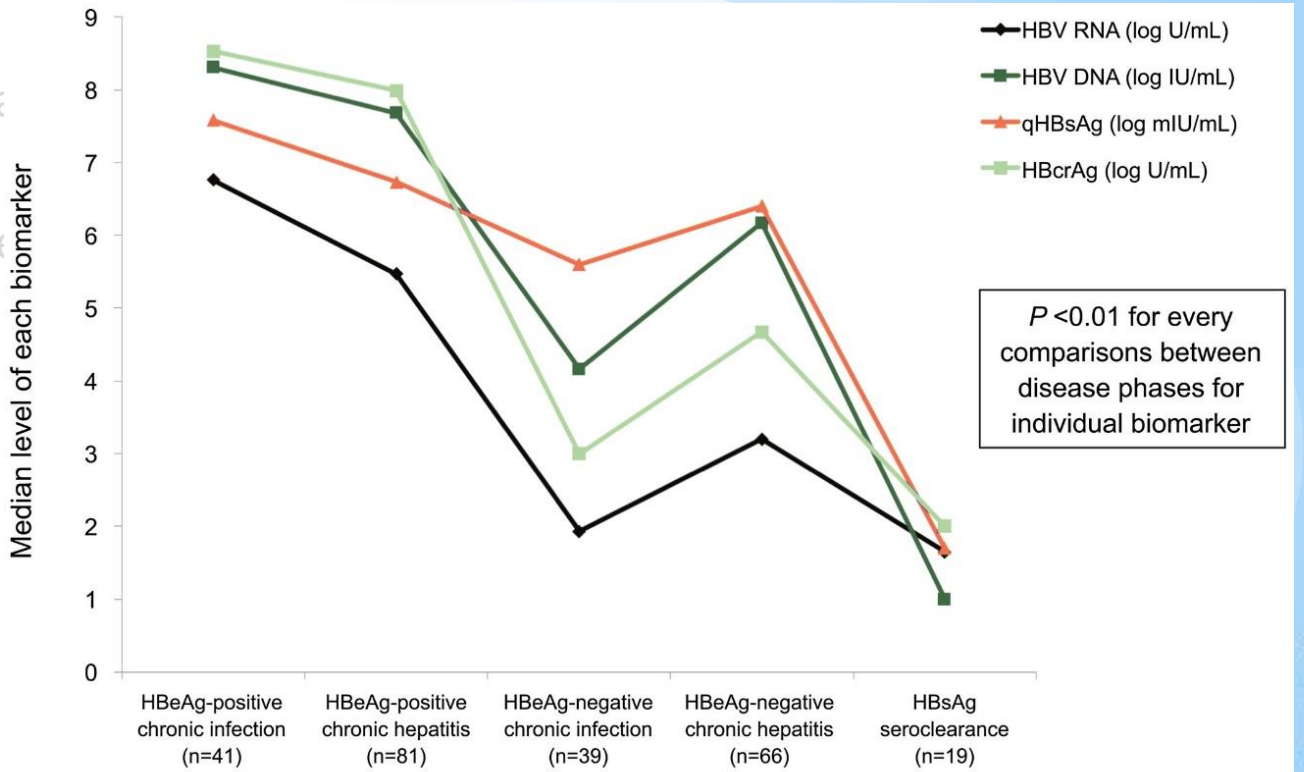


Liu, Y. *et al. BMC Gastroenterol* 2019

Cuantificación ARN-VHB

- Potencial para discriminar fases de infección
  - RNA sérico y Ratio ARN sérico/ADNih es ma
  AgHBe(-) (Wang 2016)
  - ARN menor en infección crónica frente a he
- Buena correlación con ADN sérico*.

También con AgHBcr, menor con AgHBs

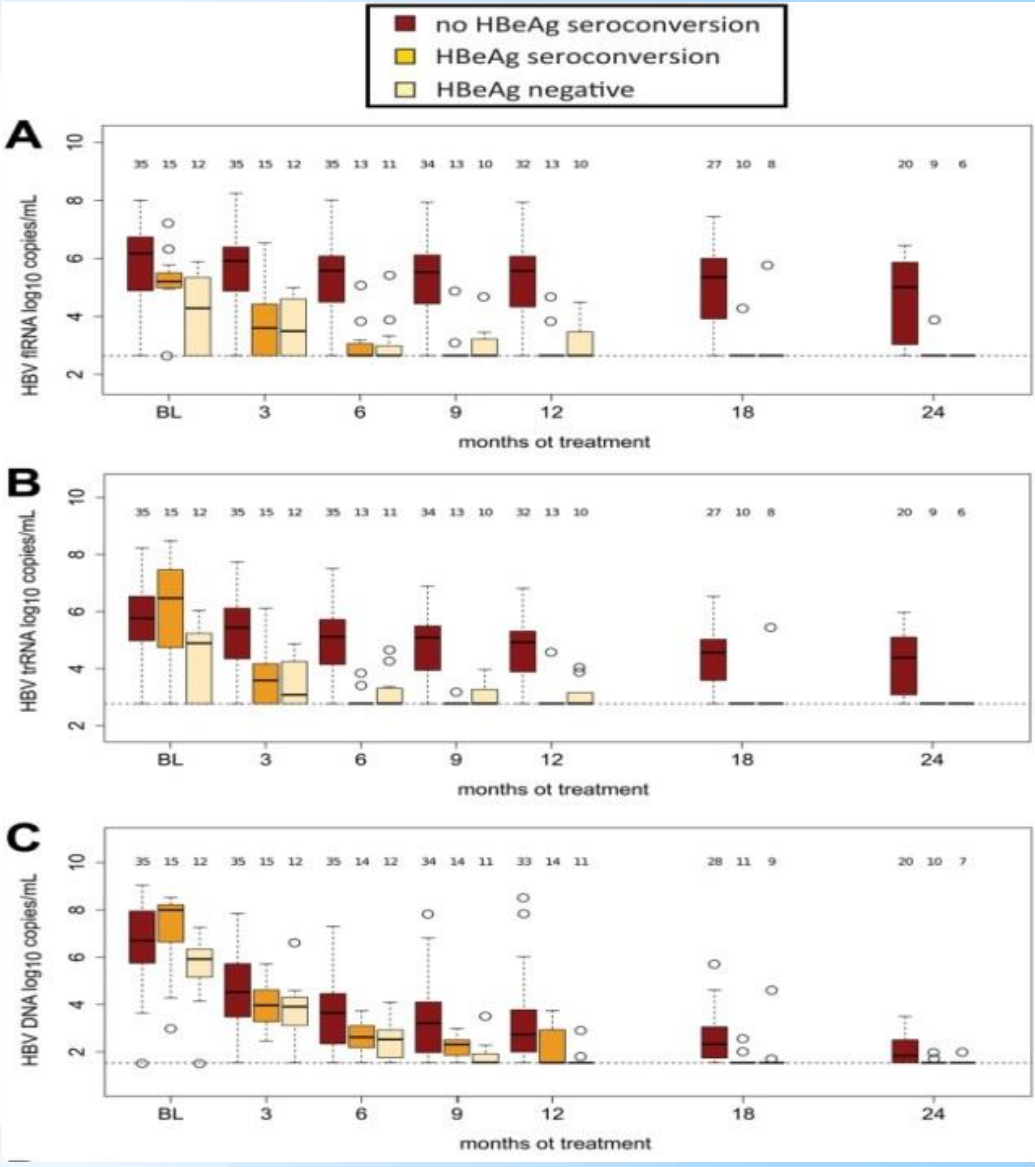


HBcrAg: hepatitis B core-related antigen, HBeAg: hepatitis B e antigen, HBV: hepatitis B virus, HBsAg: hepatitis B surface antigen, qHBsAg: quantitative hepatitis B surface antigen

Mak LY et al Hepatology 2020

Cuantificación ARN-VHB

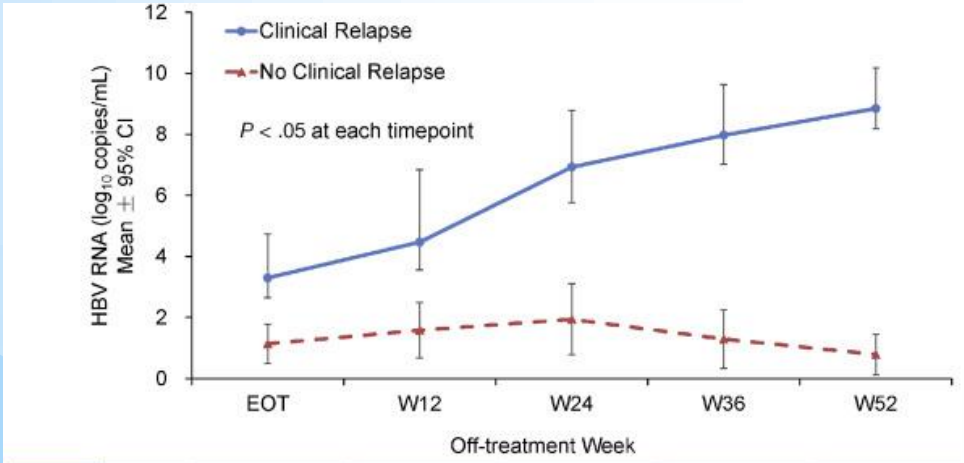
- Monitorizar tratamiento
  - Descenso semana 12/24 predice respuesta tto y seroconversión AgHBe (Van Bommel 2015; Huang 2015)



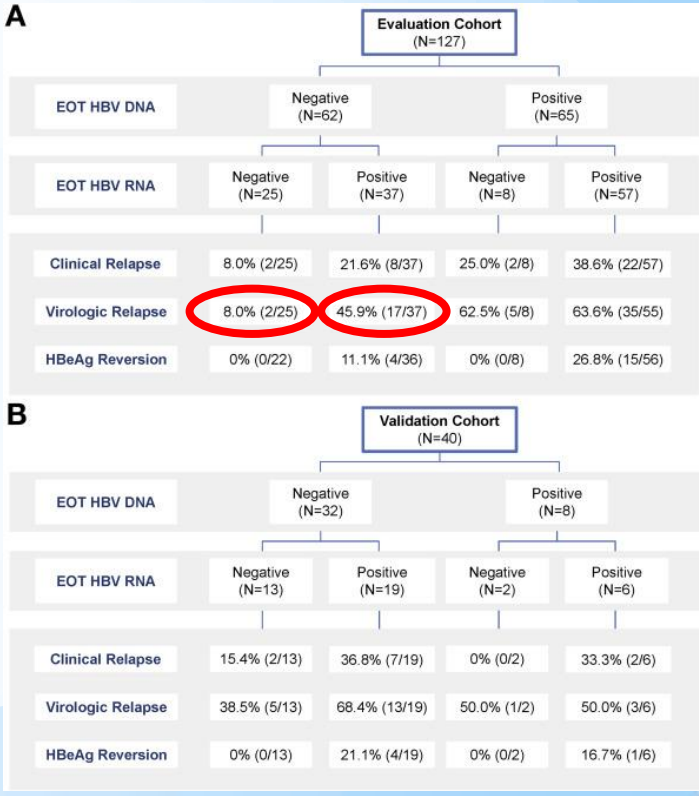
Van Bommel et al Hepatology 2015

Cuantificación ARN-VHB

- Monitorizar tratamiento
  - Descenso semana 12/24 predice respuesta tto y seroconversión AgHBe (Van Bommel 2015; Huang 2015)
  - Negativización como regla de parada (junto a ADN)(*Fan et al 2020*)
  - Riesgo de reactivación menor si ARN-VHB negativo (*Fan et al 2020*)



		EOT	W12	W24	W36	W52
Clinical Relapse	N	7	7	6	3	2
	Median	3.7	4.4	7.5	8.1	8.8
	P25-75	3.1 - 4.2	3.2 - 6.1	6.9 - 8.1	7.5 - 8.5	8.7 - 9.0
No Clinical Relapse	N	25	25	24	23	21
	Median	0	0	0	0	0
	P25-75	0 - 3.0	0 - 3.3	0 - 3.2	0 - 3.0	0 - 0.8



Cuantificación ARN-VHB

- Potencial para discriminar fases de infección
  - Ratio ARN sérico/ADNih es mayor en infeccion crónica AgHBe(+) que en AgHBe(-) (Wang 2016)
  - ARN menor en infección crónica frente a hepatitis crónica en pacientes AgHBe (Liu 2019)
- Buena correlación con ADN sérico*. Tambéen con AgHBcr, menor con AgHBs (Mak el al 2020)
- Monitorizar tratamiento
  - Descenso semana 12/24 predice respuesta tto y seroconversión AgHBe (Huang 2015)
  - Predictor de inmunocontrol tras tratamiento con peg IFN
  - Negativización como regla de parada (junto a ADN)(Fan et al 2020)
  - Riesgo de reactivación menor si ARN-VHB negativo (Fan et al 2020)
- Monitorizar actividad transcripcional y cccADN (incluso pacientes que negativizan ADN)
- Predictor Hepatocarcinoma (HCC).
  - Correlación ARN sérico con pgARN ih y daño hepático (*Vachon 2021; Mak 2020*)
  - pgARN ➔ IFNs y citoquinas➔cambios histologicos➔HCC (*Sato 2015; Halgand 2018*)

Cuantificación ARN-VHB

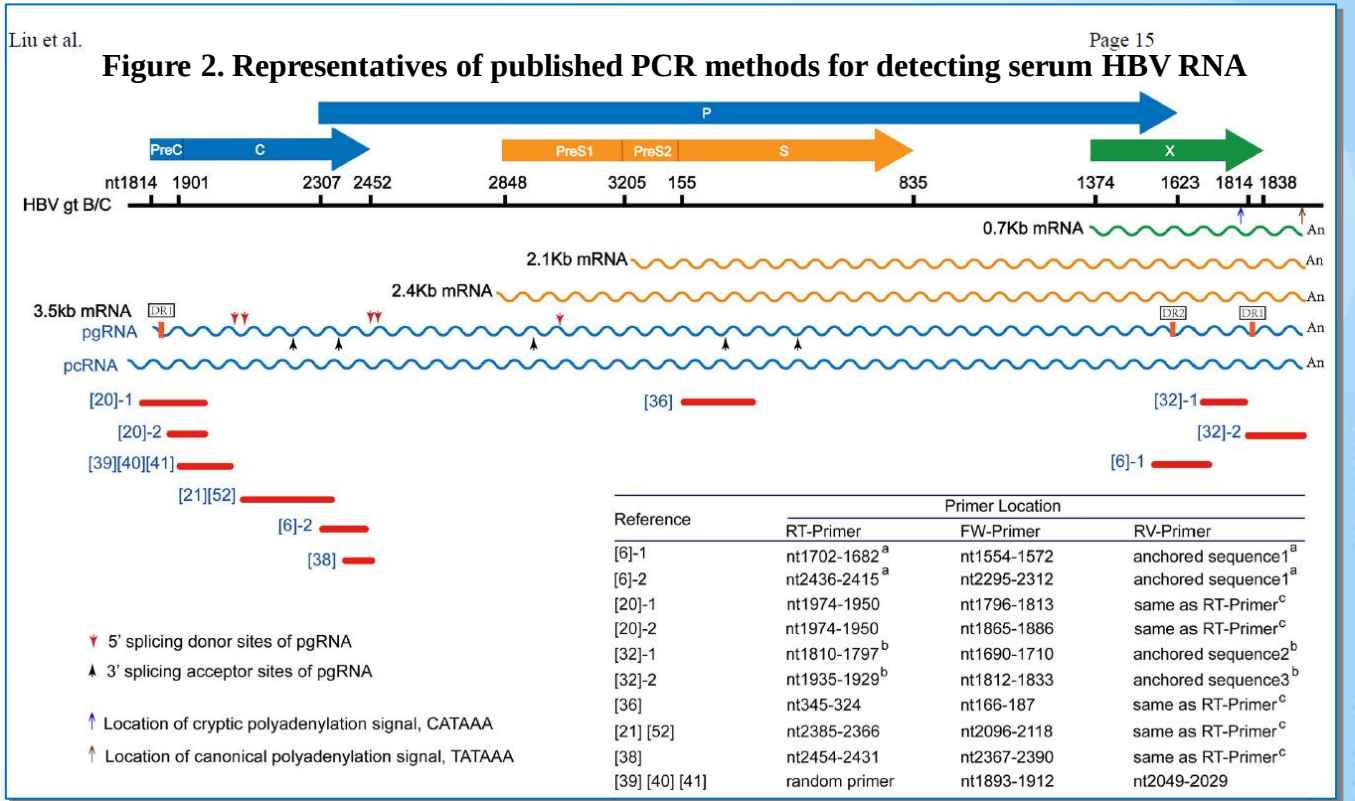
- Métodos:
  - Amplificación rápida de extremos cADN (RACE)-RT-qPCR (flARN y trARN)
  - RT-qPCR estándar
  - PCR digital sobre gota (ddPCR)

- Limitación:
  - Falta de metodología estandarizada
  - Dianas estudiadas diferentes

Liu et al, Hepatology. 2019

Cuantificación ARN-VHB

- Métodos:
  - Amplificación rápida de extremos cADN (RACE)-RT-qPCR (flARN y trARN)
  - RT-qPCR estándar
  - PCR digital sobre gota (ddPCR)
- Limitación:
  - Falta de una metodología estandarizada
  - Diana estudiada diferente



Liu et al. Page 15

Figure 2. Representatives of published PCR methods for detecting serum HBV RNA

Reference	Primer Location		
	RT-Primer	FW-Primer	RV-Primer
[6]-1	nt1702-1682[a]	nt1554-1572	anchored sequence1[a]
[6]-2	nt2436-2415[a]	nt2295-2312	anchored sequence1[a]
[20]-1	nt1974-1950	nt1796-1813	same as RT-Primer[c]
[20]-2	nt1974-1950	nt1865-1886	same as RT-Primer[c]
[32]-1	nt1810-1797[b]	nt1690-1710	anchored sequence2[b]
[32]-2	nt1935-1929[b]	nt1812-1833	anchored sequence3[b]
[36]	nt345-324	nt166-187	same as RT-Primer[c]
[21] [52]	nt2385-2366	nt2096-2118	same as RT-Primer[c]
[38]	nt2454-2431	nt2367-2390	same as RT-Primer[c]
[39] [40] [41]	random primer	nt1893-1912	nt2049-2029

Liu et al, Hepatology. 2019

- Metodos

Methods for quantifying serum HBV RNA

Methods	RT Primer[a]	Primer sites	References
RT-qPCR	HBV specific primer	X or C or S region	[6], [20], [36], [37], [38], [43]
ddPCR[b]	HBV specific primer	X or C region	[21], [38], [52]
3'RACE-based[c] qPCR	Oligo(dT) primer	poly A tail	[32], [33], [34], [35]
QuantiGene assays[d]	n/a[f]	n/a[f]	[42]
Indirect quantification[e]	HBV specific primer	PreC and C region	[39], [40], [41]

[a]The primer for reverse transcription of serum HBV RNA into cDNA;

[b]Droplet digital PCR;

[c]A rapid amplification of complimentary DNA (cDNA)-ends (RACE)-based real-time polymerase chain reaction (PCR) technique;

[d]QuantiGene Plex assays are hybridization-based and use branched DNA (bDNA) signal amplification technology;

[e]Serum HBV RNA values equal to HBV nucleic acid determined by real-time RT-PCR minus HBV DNA determined by real-time PCR;

[f]Information not available.

Liu et al, Hepatology. 2019

Gastroenterología y Hepatología 2020;43(9):559–587

ELSEVIER

Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia

DOCUMENTO DE CONSENSO

Documento de consenso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado sobre el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B (2020)

Manuel Rodríguez[a,*], María Buti[b], Rafael Esteban[b], Sabela Lens[c], Martín Prieto[d], Emilio Suárez[e] y Javier García-Samaniego[f,*]

e) Nuevos marcadores del VHB.

1.- AgHBcr - correlación con la **actividad transcripcional** del ADNccc (HBeAg negativo)

- Se determina mediante una técnica de electroquimioluminiscencia.
- HBcrAg "puede" ser superior al qHBsAg para **identificar** pacientes con **infección crónica HBeAg negativo** (portador inactivo)
- **predecir la recidiva** viral tras la suspensión del tratamiento con análogos

2.- **ARN-VHB**

- el mejor indicador de la **actividad transcripcional** del ADNccc.
- **No** existen ensayos **estandarizados** para su determinación.
- **Predice la recidiva** viral tras la suspensión del tratamiento con análogos.

Rodríguez et al. Gastroenterología y Hepatología, 2020

Conclusiones

- La **combinación de los diferentes biomarcadores** del VHB es la única forma de alcanzar una visión global de la enfermedad.
- **Se necesitan estudios** con mayor numero de población y mayor diversidad para aclarar algunas discrepancias, fundamentalmente a la hora de establecer reglas de parada de tratamiento.
- Los nuevos marcadores virales están llamados a jugar un **importante papel en el manejo de los nuevos tratamientos** de la hepatitis crónica, tanto antivirales como los nuevos agentes inmunomoduladores.
- La información de los biomarcadores de replicación viral se debe de analizar junto a los **nuevos biomarcadores no invasivos fisiopatológicos y de estado inmune** (marcadores genéticos, microRNAs, marcadores de inmunidad e inflamación y citoquinas).

Nuevos marcadores para la manejo de la infec or Virus de la H tis B

Juan Carl as

UGC Enferm y Microbiología

Hospital Univ AGS Jerez, costa noroeste y

e Cádiz. INiBICA.

Gracias por su atención

INiBICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN BIOMÉDICA DE CÁDIZ