



UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

**Caracterización virológica de los pacientes
tratados frente al virus de la hepatitis C con
antivirales de acción directa libres de interferón
que no consiguen respuesta viral sostenida**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Doctoranda: Ana Belén Pérez Jiménez

Granada, 2019

Director de tesis: Dr. Federico García García

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Belén Pérez Jiménez
ISBN: 978-84-1306-202-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55745>

*Nuestra recompensa
se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado;
un esfuerzo total es
una victoria completa.*

(Mahatma Gandhi)

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, D. Federico García, por la confianza depositada en mí desde el primer día que aparecí en el laboratorio. Por haberme hecho crecer profesionalmente y enseñarme el mundo de la investigación; creo que no podría haber tenido mejor maestro. Gracias por las oportunidades brindadas.

A todo el Servicio de Microbiología del PTS por la cálida acogida que recibí desde el minuto uno, sois geniales. Permittedme una mención especial a mi equipazo de Biología Molecular, por todo lo vivido y lo aprendido a vuestro lado: Martiña, gracias por tus consejos y tu amistad ya desde 2013 cuando aterricé en el Clínico; Natalia, gracias por enseñarme tanto, enseñarme a despegar en el mundo de la hepatitis y por tantas risas; a José Antonio y Maria Dolores, gracias por tantos buenos momentos compartidos, las risas y, hasta los bailes en nuestra pista, jeje, Pepi, gracias por tu buen humor y por tus cantos que siempre alegran y, Carmela –sí, ya sé que ya no eres de Molecular, pero para mí, formas parte del equipazo- gracias, también por las risas que nos echamos. Como os decía ahí, y lo mantengo, sois la élite, y lo sabéis; y he sido afortunada de haber podido trabajar con vosotros, compartir tantos momentos y haber aprendido tanto a vuestro lado; os doy las gracias de corazón porque he aprendido cosas con todos y cada uno de vosotros. Sabéis que esto no hubiera sido posible sin vosotros y es que es ‘un poco vuestra’ también. Se echan de menos esos desayunos (algunas veces, incluso con tostada ‘muy tostada’), jajaja. Grandes profesionales en ese Servicio y mi más sincero agradecimiento del primero al último, Fernando, Mari Carmen, Jose, Hita, Paqui,..... gracias, gracias, a todos porque recuerdo esa etapa con una sonrisa. Gracias a José Ángel, por ser un gran apoyo en el día a día y por las risas que nos hemos echado en los congresos.

También quiero aprovechar para dedicar y compartir este trabajo a los compañeros del Morales, donde aprendí de qué iba esto de la Microbiología y que tanto me enseñaron. Gracias a todos; sois un gran equipo y mejores personas. Gracias a Carmen G. por ser un referente para mí, a Rosa Blázquez,

a Carmen Alemán, a Cristóbal, a Chelo, a Mercedes,...en definitiva, a todos. A mis microbichas: Rosa, Leti, Candel, Lore, C. Cuadrado, Cristina, Vanina....gracias por ser como sois, por tantas risas y buenos momentos y por vuestros ánimos. Al final, ¡lo conseguí!

Agradecer también a mis compañeros de Córdoba, quienes me han acogido de maravilla desde el primer día y que me han brindado el apoyo y los ánimos para sacar este trabajo adelante.

Gracias a mis amig@s, porque aunque estén más cerca o más lejos, sé que siempre estáis ahí y os alegráis de mis logros.

Por supuesto, agradecer a todos los profesionales de los centros participantes por su colaboración y su disposición siempre; ha sido un verdadero placer trabajar con vosotros. Porque cada pasito hacia la erradicación de esta enfermedad es una victoria y con profesionales como vosotros, seguro será más fácil conseguirlo. Y, por supuesto, muchas gracias a los pacientes que han aceptado formar parte de este proyecto; desde luego, sin ellos no hubiera sido posible.

Y por último, a lo más importante de mi vida, mi familia. Gracias a mis padres por haber creído siempre en mí y animarme a seguir adelante siempre en todo lo que me proponga; soy como soy gracias a vosotros y mis logros, son también los vuestros. Dándoos sólo GRACIAS, me quedo enormemente corta. Gracias también, a mi hermana y Manolo, por creer que era capaz y por animarme siempre. A mis sobrinos, Iván y Éric, gracias por ser como sois, no cambiéis nunca, os adoro desde que os vi por primera vez. Gracias. Y, cómo no, GRACIAS, GRACIAS y GRACIAS a Germán, por creer en mí, por apoyarme, por aguantar mi estrés; por completarme. Gracias por tu apoyo incondicional. Y para finalizar, a mi Wendy, por ser capaz de sacarme una sonrisa cada día y animarme.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	11
PALABRAS CLAVE	15
ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	19
ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VIRUS Y VARIABILIDAD GENÉTICA	21
CICLO BIOLÓGICO DEL VHC	25
ANTECEDENTES Y EPIDEMIOLOGÍA	26
Vías de transmisión	28
IMPLICACION CLÍNICA DEL VHC: HEPÁTICA Y EXTRAHEPÁTICA	29
TRATAMIENTO FRENTE AL VHC	31
DETECCIÓN DE SARs Y SU IMPLICACION EN LA RVS	39
GUÍAS DE TRATAMIENTO FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C	39
DOCUMENTO DE CONSENSO DEL GRUPO ESPAÑOL DE ESTUDIO DE LAS HEPATITIS VIRICAS (GEHEP). Actualización 2018	44
MEDIDAS PARA LA ERRADICACIÓN DEL VHC	45
OBJETIVOS	49
JUSTIFICACIÓN	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE SARs	59
MATERIAL Y MÉTODOS DEL ESTUDIO DE REINFECCIONES vs RECIDIVAS	78
RESULTADOS	83
RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN VIROLÓGICA DE LOS PACIENTES QUE HAN FALLADO A REGÍMENES CON ALGÚN INHIBIDOR DE NS5A	85
Fallos a regímenes basados en sofosbuvir-ledipasvir	87
Fallos a regímenes basados en sofosbuvir-daclatasvir	96
Fallos en regímenes que contienen ombitasvir	100
RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SARs BASALES	106
RESULTADOS DEL ESTUDIO DE REINFECCION vs RECIDIVA	113

DISCUSIÓN	127
FINANCIACIÓN	143
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXOS	163

RESUMEN

La hepatitis C es una enfermedad del hígado causada por el virus del mismo nombre que puede dar lugar a una infección aguda o crónica. Este virus se considera la primera causa de cirrosis descompensada, de carcinoma hepatocelular, de trasplante hepático y de muerte por causa hepática.

Según la Organización Mundial de la Salud, hay aproximadamente 71 millones de personas infectadas con el virus de la hepatitis C (VHC) en todo el mundo y cada año se diagnostican 1,75 millones de personas. El hecho de compartir vías de transmisión con el VIH hace que un grupo importante de población que sufre esta enfermedad se encuentra coinfectada con el virus de la inmunodeficiencia humana. En los enfermos que realizan tratamiento con antivirales de acción directa (AADs), la respuesta viral sostenida (RVS) tras el tratamiento frente a la hepatitis C parece reducir, además, el riesgo de progresión de la infección por VIH y las muertes de causa no hepática. Estos nuevos antivirales han marcado un antes y un después en la cura de esta enfermedad. La terapia libre de interferón con nuevos antivirales de acción directa (AADs) abre las puertas a la erradicación de la hepatitis C. Para ello serán necesarios esfuerzos en todos los ámbitos de la salud pública, en la epidemiología, en la clínica, y también en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento.

Los AADs actúan directamente sobre distintas regiones del genoma del virus: la región NS3, NS5A y NS5B, respectivamente. Estos fármacos se utilizan en distintas combinaciones entre sí, normalmente cubriendo varias dianas a la vez. En la actualidad, en España, se encuentran comercializados inhibidores de la polimerasa NS5B (dasabuvir y sofosbuvir), inhibidores de la fosfoproteína NS5A (daclatasvir, ledipasvir y ombitasvir, velpatasvir, elbasvir) e

inhibidores de la serinproteasa NS3 (boceprevir, telaprevir, simeprevir, paritaprevir, grazoprevir y voxilaprevir).

A pesar de que los AADs tienen una eficacia superior al 90%, existen casos en los que no se consigue respuesta viral sostenida. Existen múltiples estudios que relacionan determinadas mutaciones genéticas en las distintas dianas de los antivirales. En España, hay pocos estudios publicados que describan datos ‘en vida real’ de prevalencia de estas sustituciones asociadas a resistencia (SARs). Es por ello que en el presente estudio hemos analizado la prevalencia de las SARs de pacientes que han fallado a una primera línea de tratamiento con AADs.

El fallo de AADs es un evento desafortunado que puede ocurrir con todos los genotipos de VHC y se asocia con frecuencia, pero no siempre, con la presencia de sustituciones asociadas a la resistencia al VHC (SARs). Hasta que los nuevos regímenes pangenotípicos, con alta resistencia genética a la barrera y potencia antiviral, estén disponibles en todos los países, los datos preliminares sugieren que el nuevo tratamiento se puede optimizar en base a las pruebas de SARs tras un fallo a AADs.

En este estudio se informa del uso de retratamiento guiado por resistencia de pacientes que fallaron los regímenes previos que contenían inhibidores de NS5A en la cohorte multicéntrica GEHEP-004. Este es el mayor estudio de cohortes de resistencia a antivirales de acción directa (ADDs) realizado en España. Nuestro objetivo es proporcionar recomendaciones sobre cómo usar la información de resistencia en situaciones donde Vosevi® puede no estar disponible. Antes del retratamiento, se realizó la secuenciación basada en la población de los genes NS3, NS5A y NS5B del VHC. Después de recibir

un informe completo de interpretación de la resistencia, se eligió el régimen de retratamiento y se registró la respuesta virológica sostenida 12 semanas después de la finalización del tratamiento (RVS12). Un total de 342 pacientes que experimentaron fallo virológico después del tratamiento con sofosbuvir / ledipasvir ± ribavirina (54%), sofosbuvir / daclatasvir ± ribavirina (23%), o paritaprevir-ritonavir / ombitasvir ± dasabuvir ± ribavirina (20%) han sido estudiados. Después de un informe de resistencia, 186 pacientes fueron retratados. Se logró una RVS12 para el 88,1% de los pacientes que fallaron después de sofosbuvir / ledipasvir ± ribavirina, el 83,3% de los pacientes que fracasaron después de sofosbuvir / daclatasvir ± ribavirina, el 93,7% de los pacientes que fallaron después de paritaprevir(ritonavir) + ombitasvir ± dasabuvir ± ribavirina. Mostramos cómo el retratamiento guiado por resistencias en conjunto con un informe interpretado permite alcanzar tasas de RVS cercanas al 90%. Nuestra hipótesis es que las tasas de RVS pueden incluso mejorarse si se discuten los datos de resistencia entre los virólogos experimentados y los clínicos que tratan. Creemos que nuestros datos pueden ser relevantes para países donde el acceso a las nuevas combinaciones de AADs es limitado.

Por otro lado, analizamos la eficacia del tratamiento de primera línea AADs con información SARs basales en pacientes sin exposición previa a estos fármacos. Hemos realizado un estudio en el que participaron centros que colaboran en la cohorte de resistencias GEHEP-004, entre 2015 y 2017. Se ha realizado secuenciación de Sanger y se ha emitido un informe completo de resistencias. Con él, el médico decidió la terapia, la duración y el uso de ribavirina. Los datos de respuesta virológica sostenida (RVS12) están disponibles en 277 pacientes. La prevalencia de SARs no superó el 10%. La eficacia del tratamiento guiado por resistencias basales en nuestra cohorte ha sido alta en los genotipos de VHC más prevalentes en España.

A pesar de las altas tasas de respuesta asociadas al tratamiento del virus de la hepatitis C (VHC), no se adquiere inmunidad protectora, lo que permite la reinfección y la infección continua. Distinguir entre recaída y reinfección es crucial para el asesoramiento del paciente y para elegir el tratamiento más adecuado. Hemos realizado un profundo análisis filogenético con múltiples genes para evaluar el genotipo y la reinfección en 53 pacientes a los que se les tomaron muestras antes del inicio de la terapia y en el momento de la evaluación de la RVS12. El 60,4% estaba coinfectado con VIH y la gran mayoría se clasificó como personas usuarias a drogas por vía parenteral (78,6%), a menudo también coinfectadas con VIH. La transmisión fue sexual en siete casos, de los cuales cinco en hombres VIH positivos que tienen sexo con hombres. En general, la recidiva viral se dio en 44 pacientes, mientras que no se llegó a ninguna conclusión para cuatro pacientes. Cinco pacientes se re infectaron con una cepa diferente de VHC, no detectándose en todos un genotipo diferente entre ambas muestras, lo que demuestra que la filogenia es necesaria no sólo para determinar el genotipo, sino también para distinguir entre la recidiva y reinfección intrasubtipo.

PALABRAS CLAVE

VHC, SARs, resistencias, AADs, antivirales, NS5B, hepatitis, NS5A, NS3, RVS, virus, secuenciación

ABREVIATURAS

AADs: antivirales de acción directa

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADVP: Adictos a drogas vía parenteral

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

ARN: Ácido ribonucleico

DCV: Daclatasvir

DSV: Dasabuvir

EBV: Elbasvir

FC: *Fold-change*

FDT: fin de tratamiento

GEHEP: Grupo Español de Estudio de Hepatitis Víricas

GT: genotipo

GCV: Glecaprevir

GRZ: Grazoprevir

HLR: Alto nivel de resistencia

HSH: hombres que tienen sexo con hombres

ILR: Nivel intermedio de resistencia

IFN: Interferón

LDV: Ledipasvir

mITT: Análisis con intención de tratar modificado

OMB: Ombitasvir

Nt: nucleótidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

Pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDS: pérdida de seguimiento

PTV: Paritaprevir

PrOD/PrO: Paritaprevir(ritonavir)/Ombitasvir±Dasabuvir

PBV: Pibrentasvir

RIC: Rango intercuartílico

RVS: respuesta viral sostenida

SARs: sustituciones asociadas a resistencia

SMV: Simeprevir

SOF: Sofosbuvir

TPI: tratamiento previo a interferón

UDS: secuenciación masiva

UI: Unidades internacionales

VEL: Velpatasvir

VHC: virus de la hepatitis C

VOX: Voxilaprevir

WT: cepa salvaje, sin SARs

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VIRUS Y VARIABILIDAD GENÉTICA

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus pequeño (50 nm de diámetro) y envuelto. Los primeros análisis por microscopía electrónica de partículas virales aisladas de muestras de suero e hígado de pacientes y chimpancés infectados mostraron la presencia de partículas esféricas de unos 33-70 nm¹⁻⁴.

Es un virus hepatotropo, perteneciente a la familia Flaviviridae, género Hepacivirus⁵. Fue identificado y caracterizado por M. Houghton en 1989⁶, tras años de investigación para la detección del genoma del virus entonces llamado noA-noB. Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de polaridad positiva que abarca unos 9600 nucleótidos (nt). El marco de lectura está flanqueado por dos regiones en los extremos 5' y 3' con estructura secundaria conservada, como se observa en la figura 1⁴. El extremo 3' es esencial para la replicación⁷. La traducción del marco de lectura da lugar a una poliproteína precursora de unos 3000 aa. Tras el procesamiento de esta poliproteína por parte de proteasas virales y del huésped, da lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2), la proteína p7 y también seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).

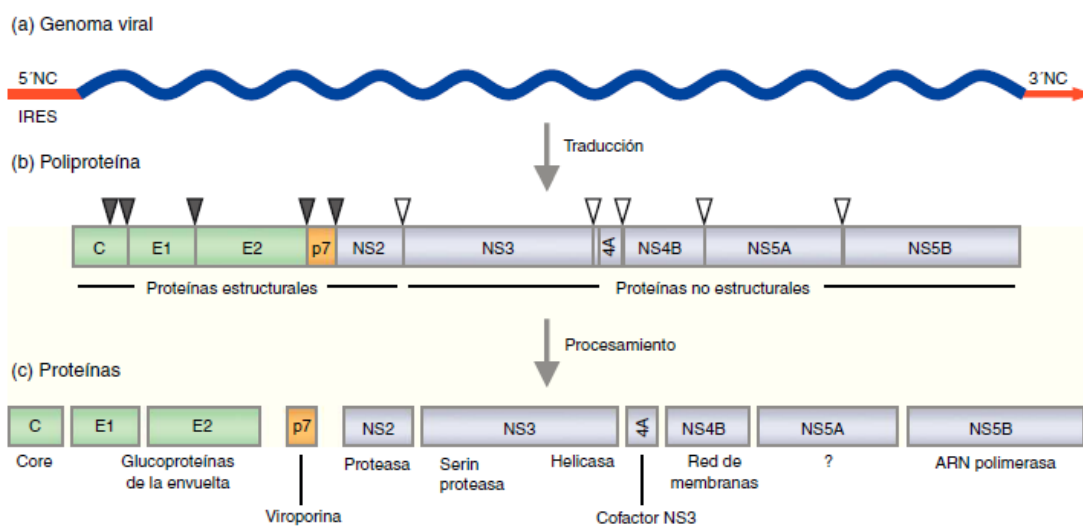


Figura 1: Esquema de la organización genómica del virus de la hepatitis C y las proteínas virales. Imagen cedida por Pérez-Del Pulgar, S.⁴

La proteína core se encuentra formando parte de la nucleocápside y ha sido relacionada con diversas vías de señalización celular importantes para el virus. Las otras 2 proteínas estructurales son responsables de la entrada y fusión viral. La proteína p7 es una proteína de membrana con función poco clara, probablemente relacionada con un canal iónico. El resto de proteínas (las no estructurales), tienen funciones relacionadas con el procesamiento de la poliproteína y con la replicación viral. Esta responsabilidad las ha convertido en dianas terapéuticas, actuando sobre su síntesis, los llamados antivirales de acción directa (AADs).

La proteasa NS2 interacciona con la proteína p7 y con la proteína estructural, jugando un importante papel en la replicación de viriones, como describe Popescu et al⁸. La proteína NS3 contiene un dominio serinproteasa en un extremo y una serin/ATPasa en el otro; proteína a la que se asocia la proteína NS4A como cofactor. Este complejo proteasa NS3-NS4A es fundamental para el ciclo vital del virus porque cataliza el procesamiento del resto de proteínas no estructurales. NS4B es una proteína de membrana que altera las membranas intracelulares, siendo este proceso vital para la formación del complejo de replicación. NS5A es una metaloproteasa fosforilada con una función no definida en el ciclo biológico del virus aunque parece interactuar con varias proteínas celulares. NS5B es una polimerasa viral, concretamente una ARN-polimerasa dependiente de ARN. Además, hay otra proteína, la llamada proteína F, la cual se genera por el desplazamiento del marco de lectura en la región de codificación de núcleo.

Una característica fundamental del VHC es su variabilidad genética, es decir, alto grado de heterogeneidad entre las secuencias genómicas y, por lo tanto, entre las proteínas codificadas. Esta característica tiene grandes repercusiones como son la dificultad para la obtención de una vacuna frente al virus o la selección de cepas mutantes durante el tratamiento. Da lugar a una población de genomas con variantes de ARN conocidas como cuasiespecies.

Dentro del genoma, hay regiones con mayor y menor variabilidad genética como, por ejemplo, la región del core, que es altamente conservada y la región hipervariable que como su nombre indica, tiene una mayor capacidad de variación. Mutaciones en esta región hipervariable puede permitir al virus mantener infecciones más persistentes y ha sido relacionado con la baja respuesta en tratamientos con interferón⁹.

La ya comentada alta variabilidad genética del virus, debida a la alta tasa de producción de viriones así como la carencia de función correctora por parte de ARN-polimerasa y de que se trate de un virus de polaridad positiva, ha forzado la evolución del virus al desarrollo de 7 genotipos y 67 subtipos distintos descritos^{10,11}. En la figura 2 quedan reflejados los distintos genotipos del VHC descritos por Bukh¹².

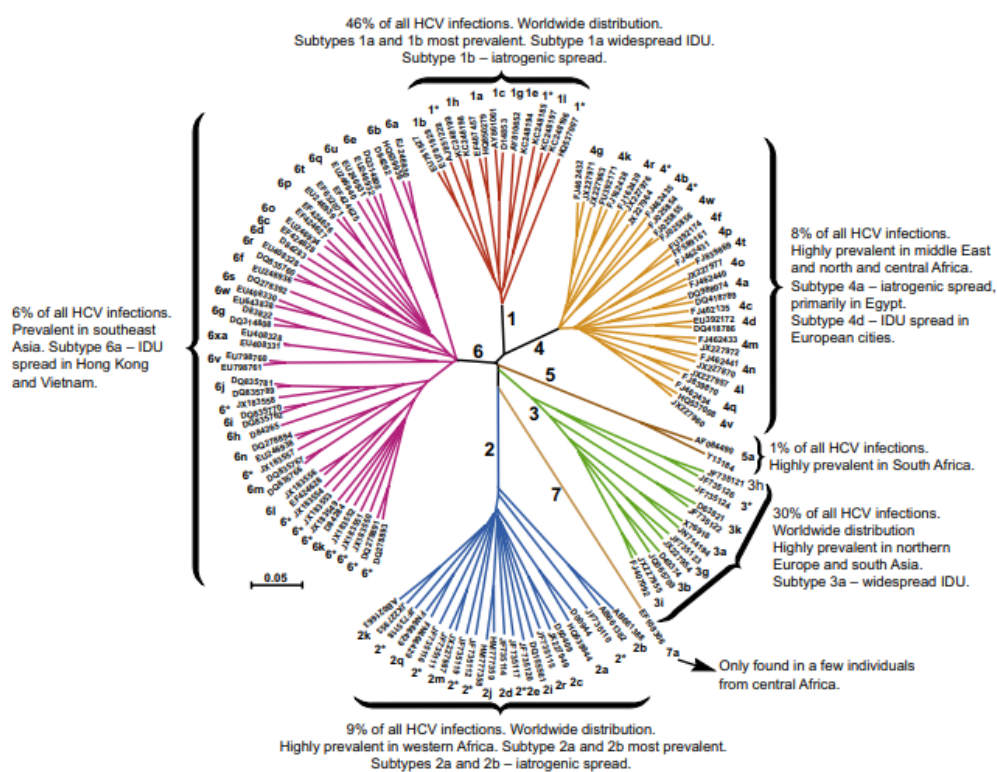


Figura 2: Árbol filogenético con la clasificación genotípica del VHC publicado por J. Bukh¹²

Recientemente, en octubre de 2018, se ha descrito un octavo genotipo detectado en pacientes de la India residentes en Canadá¹³, publicado por Borgia et al. En este estudio, detectan cuatro casos a los que se les asigna GT-5 tanto con el ensayo LiPA como con el de Abbott RealTime, pero se vio que era genéticamente distinto a los 7 genotipos previamente descritos con más del 30% de divergencia en la secuencia de nucleótidos obtenida.

La alta variabilidad genética del virus dificulta la determinación rutinaria del genotipo viral. Existen distintos métodos y plataformas comerciales para la determinación del genotipo, pudiendo diferir los resultados, fundamentalmente a nivel de subtipo, en función de las dianas genómicas que utilice. De hecho, existen varios estudios comparativos entre distintas plataformas que muestran como las técnicas que incluyen NS5B como diana, obtienen mejores resultados^{14,15}.

En el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C, la correcta determinación del genotipo ha sido determinante para la elección de un régimen óptimo y un resultado eficaz. En los últimos meses, han aparecido terapias frente al VHC consideradas pangentípicas que hacen plantearse la necesidad de la determinación del genotipo previo al inicio de la terapia. Al margen del cuestionable planteamiento de la necesidad de la determinación basal del genotipo, debe considerarse la importancia de éste a nivel epidemiológico para poder detectar probables brotes epidémicos o la diferenciación entre recidivas y reinfecciones en un mismo paciente, como veremos en el presente trabajo.

CICLO BIOLÓGICO DEL VHC

La replicación del VHC se da fundamentalmente en los hepatocitos pero se han detectado genomas y antígenos virales en otras células como células mononucleares de sangre periférica, células dendríticas o en el sistema nervioso central.

En su ciclo biológico^{4,16}, el virus pasa por distintas etapas que se resumen a continuación y se muestran gráficamente en la figura 3:

- 1) Primeramente, destacar que la partícula viral circula libre o asociada a lipoproteínas (formando las llamadas lipovirionpartículas)
- 2) La interacción inicial del virión con la membrana celular está mediada por glucosaminoglucanos (GAG) para concentrar el virus en la superficie celular. A continuación, el VHC interacciona de manera secuencial con diversos receptores, algunos de ellos, reguladores de la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática.
- 3) La entrada en el hepatocito se produce por endocitosis dependiente de clatrina
- 4) La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma
- 5) Desencapsidación y liberación del ARN viral
- 6) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína por proteasas virales y del huésped
- 7) Replicación del ARN viral en el complejo de replicación, asociado a la red de membranas
- 8) Formación de la cápside y ensamblaje de los nuevos viriones alrededor de las gotas lipídicas
- 9) Las partículas del VHC se asocian a lipoproteínas y son liberadas a través de la vía de secreción celular

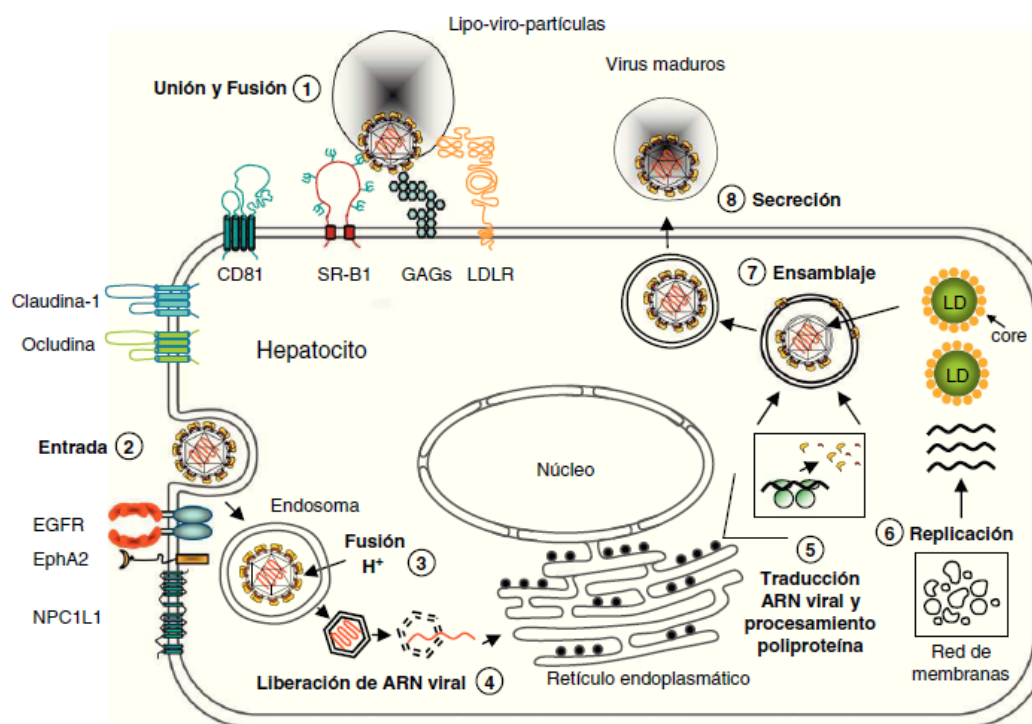


Figura 3: Representación del ciclo biológico del VHC. Imagen cedida por Pérez-Del Pulgar, S.⁴.

ANTECEDENTES Y EPIDEMIOLOGÍA

Según la Organización Mundial de la Salud, hay aproximadamente 71 millones de personas infectadas con el virus de la hepatitis C (VHC) en todo el mundo y cada año se diagnostican 1,75 millones de personas. Por otro lado, se estima que cada año, mueren unas 399.000 personas en el Mundo a causa del virus de la hepatitis C, sobretodo por cirrosis y por hepatocarcinoma¹⁷. La misma organización, estima que entre el 15 y el 45% de las personas infectadas, elimina el virus espontáneamente en un plazo igual o inferior a seis meses, sin necesidad de tratamiento alguno. Por el contrario, el 60 y el 80% restante, desarrollará infección crónica; en estos casos, el riesgo de cirrosis hepática a los 20 años, según la fuente, varía entre el 10-30%.

La hepatitis C es prevalente en todo el mundo. Las regiones de la OMS más afectadas son las del Mediterráneo Oriental y Europa, con una prevalencia del 2,3% y 1,5% respectivamente. La prevalencia de la infección por VHC en otras regiones de la OMS oscila entre el 0,5% y el 1,0%. En función del país, la infección por el virus de la hepatitis C puede concentrarse en algunas poblaciones (por ejemplo, entre los consumidores de drogas inyectables), y/o en la población en general. La distribución de genotipos del VHC es variable según la región. Puede verse la prevalencia según la región gráficamente en las figuras 4 y 5.

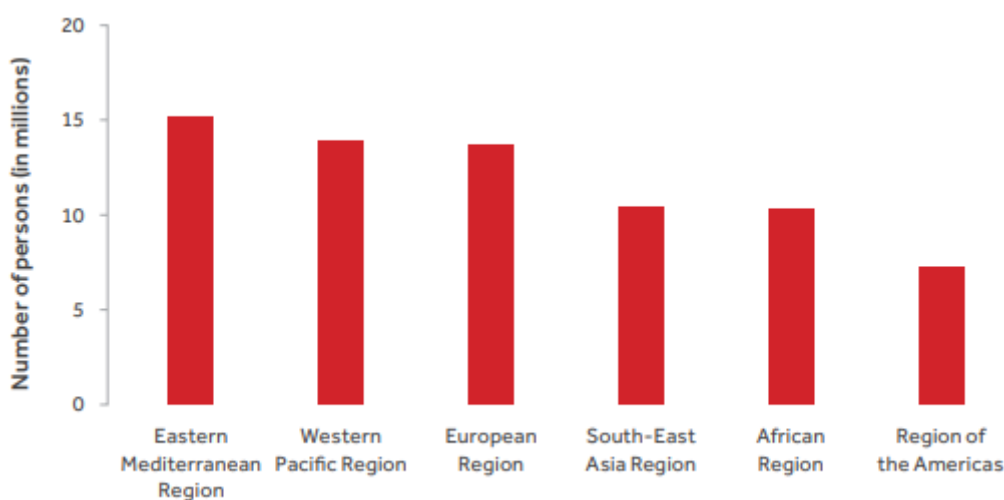
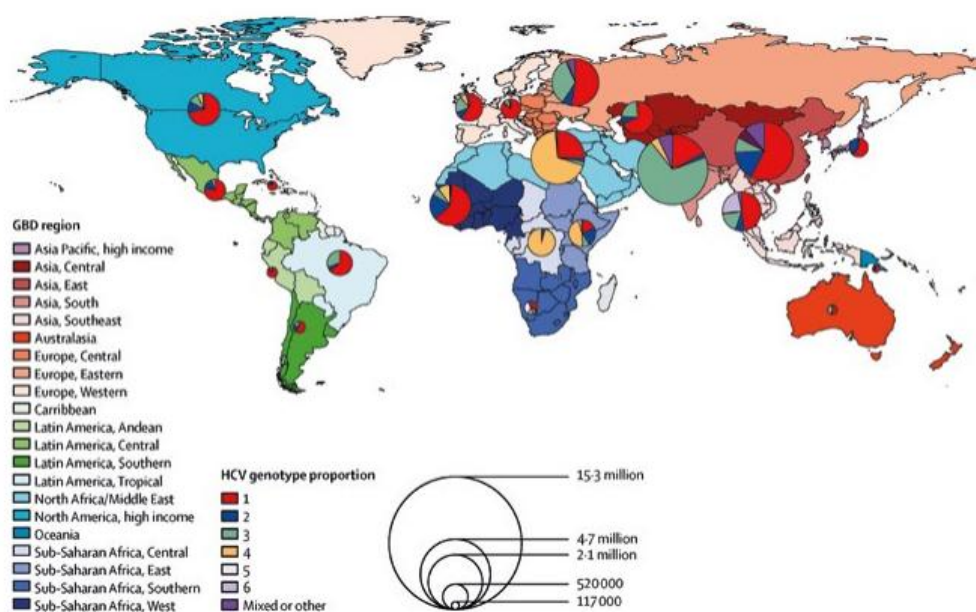


Figura 4: Prevalencia de infección por VHC (ARN positivo) en la población general, por región, con intervalos de incertidumbre. OMS; año 2015.

En España, se han realizado estudios de prevalencia del virus de la hepatitis C como el realizado sobre la cohorte Gehep-005¹⁸. Es el mayor estudio sobre la prevalencia y distribución de genotipos de VHC en España entre los años 2000 y 2015, relacionados con factores clínicos, epidemiológicos y virológicos. Es un estudio multicéntrico, realizado en 10 comunidades autónomas.



Source: The Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2:161–76.
Disclaimer: This map is reproduced as originally published.

Figura 5: Distribución Mundial de la infección por VHC según genotipo, publicado por The Polaris Observatory HCV Collaborators, 2015¹⁹.

Se incluyeron más de 48.000 pacientes con infección crónica por el VHC, siendo el genotipo más frecuente el genotipo 1 (66,9%) (24,9% subtipo 1a y 37,9% subtipo 1b), 2,8% GT-2, 17,3% GT-3, 11,4% GT-4, 0,1% GT-5 y 0,02% GT-6. En este estudio se confirma que las distribuciones de genotipos varían con la coinfección por edad, sexo, VIH y VHB y dentro de áreas geográficas y grupos epidemiológicos.

Vías de transmisión

La transmisión del VHC es principalmente a través de la exposición a sangre infectada. Los riesgos de transmisión incluyen transfusión de sangre (sobre todo, antes de 1992), uso de drogas intravenosas, actividad sexual de alto riesgo, trasplante de órganos sólidos de un donante infectado, exposición

ocupacional, hemodiálisis, exposición doméstica, nacimiento de una madre infectada y consumo intranasal de cocaína.

Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU., los factores de riesgo más comunes para la infección aguda por VHC, desde 1991 hasta 1995, fueron las drogas intravenosas (60%) y las conductas sexuales (20%). Otros modos de transmisión (ocupacional, hemodiálisis, domiciliaria y perinatal) representaron aproximadamente el 10% de las infecciones. Se puede identificar un factor de riesgo potencial en aproximadamente el 90% de las personas con infección por VHC. En el 10% restante, no se puede identificar una fuente reconocida de infección.

IMPLICACION CLINICA DEL VHC: HEPÁTICA Y EXTRAHEPÁTICA

Tras el momento de la infección por el VHC, se entra en la denominada fase aguda. La hepatitis aguda por el VHC no suele cursar con síntomas, pero las personas que sí los presentan manifiestan habitualmente astenia, ictericia y orina oscura. En el 10%-30% de las infecciones agudas por hepatitis C, el virus desaparece espontáneamente sin tratamiento, lo que significa que deja de ser detectable en la sangre. En estos casos, los pacientes muestran, a menudo, una recuperación completa y, a veces, ni siquiera son conscientes de que han estado expuestos a dicho virus. Sin embargo, pueden seguir dando positivo en los análisis de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.

Desgraciadamente, la evolución más frecuente de la infección es hacia la cronicidad (70%-90% de las personas que se infectan por el virus de la hepatitis C). En la hepatitis C crónica, el VHC sigue provocando daño hepático durante períodos prolongados. Dado que muchas personas con hepatitis C

crónica se mantienen sin síntomas durante años, la infección con frecuencia no se diagnostica, o bien, se diagnostica de manera casual. Debido a que los pacientes pueden no ser conscientes de que tienen hepatitis C, no reciben el tratamiento o asesoramiento adecuados para ayudar a reducir o prevenir una mayor lesión hepática. En ocasiones, en un cuadro de infección crónica, algunos pacientes sufren trastornos extrahepáticos consecuencia de la infección por VHC, como trastornos articulares o cutáneos. Estos pacientes pueden tener manifestaciones autoinmunitarias con clínica muy variable^{20,21}.

El período de incubación es de 14–180 días (promedio 45 días), y actualmente no se dispone de vacunas contra la hepatitis C. Predictores de cronicidad en la infección por VHC son²²:

- Sexo masculino
- Edad >25 años en el momento de la infección
- Infección aguda asintomática
- Etnia afroamericana
- Infección por VIH
- Inmunosupresión

La infección por hepatitis C habitualmente avanza lentamente en un período de muchos años, y entre 10% y 20% de los pacientes con hepatitis crónica pueden pasar a desarrollar cirrosis hepática en un período de 20 años. En la siguiente figura (figura 6) se muestra la historia natural del VHC, publicada por Chen et al²².

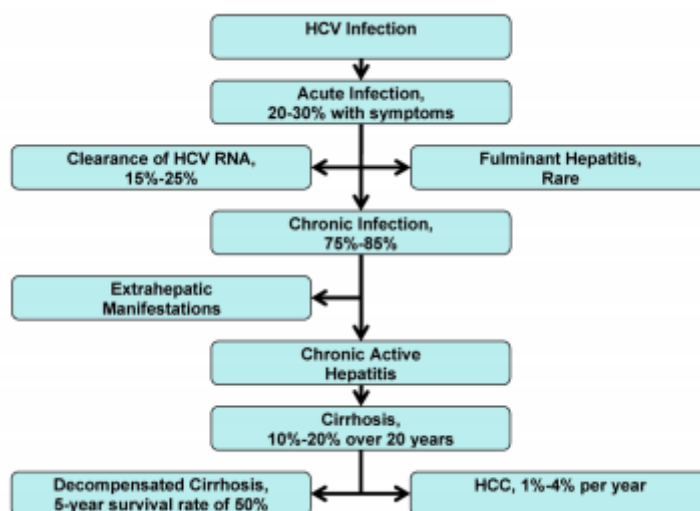


Figura 6: Evolución natural del VHC

TRATAMIENTO FRENTE AL VHC

- **REGÍMENES CON INTERFERON:**
- Interferón pegilado:

Existen dos tipos, el interferón pegilado alfa-2a y el alfa-2b, unidos a moléculas de polietilenglicol de distintos tamaño y configuración. El interferón pegilado alfa-2a está unido a una molécula de polietilenglicol ramificada de 40 kDa de peso molecular, mientras que el interferón pegilado alfa-2b, lo está a una molécula lineal de 12 kDa. El interferón pegilado alfa-2a, debido al mayor tamaño de su molécula, tiene una semivida más larga y menor acción antiviral, mientras que el alfa-2b tiene una semivida más corta y mayor acción antiviral en humanos. Sin embargo, hoy se sabe que la acción del interferón no depende de su tamaño, sino de su unión a un receptor específico de la membrana, el

receptor tipo I del interferón. Al unirse el interferón a la porción extracelular del receptor, se desencadena en el citoplasma una activación de cinasas específicas (TYK-2 y JAK-1) y de las vías de transducción (STAT 1 y 2), que terminan con la transcripción de varios genes que participan en la síntesis de proteínas responsables de la respuesta celular antiviral. También el interferón induce la producción de distintas citocinas que participan en la respuesta antivírica y potencia la respuesta inmune celular específica contra las células infectadas por el virus²³. Desde la aparición de los nuevos antivirales de acción directa, el uso del interferón como tratamiento en la infección por VHC, ha quedado muy relegado, debido a los frecuentes e importantes efectos adversos que, a menudo, acompaña.

- Ribavirina:

Es un nucleósido sintético que actúa sobre distintos virus, entre ellos, el virus de la hepatitis C. La ribavirina (RBV) sufre un proceso de fosforilación en las células infectadas utilizando enzimas tisulares como la adenosin kinasa. La ribavirina monofosfato inhibe la síntesis de guanósín monofosfato, reduciendo sus niveles intracelulares. La ribavirina trifosfato inhibe la enzima mRNA-guanililtransferasa inhibiendo la síntesis de ARN mensajero vírico y también ARN polimerasa. En el caso del VHC ejerce su efecto antiviral a través diversos mecanismos, entre ellos, mutagénesis letal.

En el tratamiento del VHC, RBV nunca se utiliza en monoterapia; ha sido utilizada durante años combinada con INF (hoy en día, esta combinación se considera una pauta subóptima, con las alternativas terapéuticas existentes) y, actualmente, también se utiliza en combinación con los AADs; según el caso y las recomendaciones de las guías, para aumentar la eficacia. El uso de RBV es una herramienta útil en aquellos pacientes difíciles de curar como los pacientes con cirrosis

descompensada o infectados por el genotipo 3 y aquellos que no han logrado una RVS después de un tratamiento con antivirales de acción directa (AADs). Puede causar efectos adversos relacionados con una disminución de la hemoglobina, sin embargo, la anemia grave es rara y fácilmente manejable con una reducción de dosis. Además, es un componente teratógeno. En la práctica, debido a que la RBV es barata y bien tolerada cuando se combina con un régimen sin interferón, sigue siendo una herramienta útil para optimizar los resultados de algunos regímenes de tratamiento contra el VHC²⁴.

Previamente a la aparición de los antivirales de acción directa, se realizaban pautas de tratamiento con interferón (pegilado) –pegINF- con o sin ribavirina (RBV). Las tasas eficacia obtenida con estas pautas, tanto en ensayo clínico cuando se comercializó el interferón pegilado, como en práctica clínica real, no eran muy altas (alrededor del 50% de eficacia), según el estudio considerado y el tipo de paciente (presencia de cirrosis, etc.). En la siguiente figura (figura 7) se muestra gráficamente la tasa de respuesta viral sostenida (RVS) en tres estudios²⁵⁻²⁸.

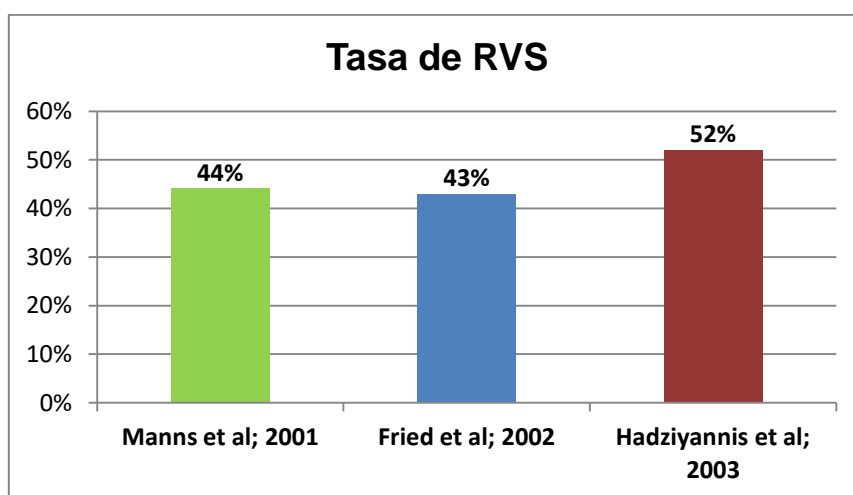


Figura 7: Tasas de RVS en distintos estudios con regímenes basados en INF

Con la aparición de los AADs, empezaron a recomendarse pautas sin INF, evitando así los frecuentes efectos secundarios/adversos producidos por este fármaco. La primera generación de AADs (boceprevir y telaprevir) sí se utilizaban combinados con INF, con o sin RBV.

- REGÍMENES BASADOS EN AADs:

Gracias a los avances en investigación que han permitido conocer en mayor profundidad la estructura genómica y el ciclo biológico del virus, se han podido explotar nuevas dianas terapéuticas que actúan directamente sobre la replicación del virus; de ahí el nombre de antivirales de acción directa (AADs).

En función de la diana terapéutica, se ha desarrollado y comercializado en nuestro país los siguientes fármacos. Un resumen gráfico de las dianas de los nuevos AADs quedan reflejados en la figura 8, cedida por N.Chueca²⁹. Destacamos tres familias de fármacos, que actúan sobre las regiones de proteínas no estructurales. En función de la diana terapéutica, podemos agrupar los fármacos de cada diana por grupo o familia, compartiendo la terminación en su denominación, es decir:

- Inhibidores de la proteasa (NS3/NS4A): los fármacos de este grupo terminan en ‘-previr’
- Inhibidores del complejo NS5A: los fármacos de este grupo terminan en ‘-asvir’
- Inhibidores de la polimerasa NS5B: estos fármacos terminan en ‘-buvir’

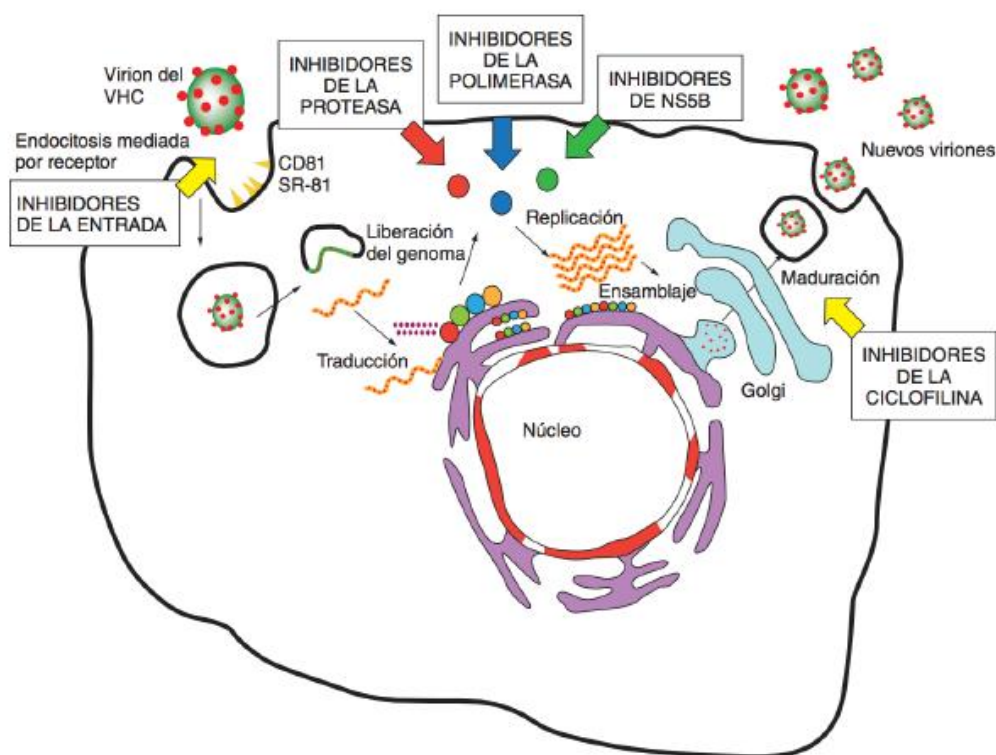


Figura 8: Dianas terapéuticas para el desarrollo de agentes antivirales de acción directa. Figura cedida por N. Chueca²⁹.

➤ **Inhibidores de la proteasa NS3:**

a) **BOCEPREVIR Y TELAPREVIR (BCV y TPV)**

Fueron los AADs de primera generación que se aprobaron en nuestro país. Eran administrados en combinación con INF y, en algunos casos, también con RBV. En este momento, no se consideran una buena opción terapéutica al haber quedado relegados por otras pautas libres de IFN y con mejores tasas de respuesta.

Su mecanismo de acción es la inhibición de la proteasa viral NS3/NS4A, y fueron aprobados para tratar la infección del VHC genotipo 1³⁰⁻³².

b) SIMEPREVIR (SMV)

Primer inhibidor de la proteasa que ha sido utilizado libre de INF, en combinación con sofosbuvir.

Es activo frente a genotipos 1, 4, 5 y 6 pero, según el informe de posicionamiento publicado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, está aprobado para genotipos 1 y 4 en nuestro país³³.

c) PARITAPREVIR (PTV)

Paritaprevir se comercializa en combinación con ombitasvir y, a su vez, potenciado con ritonavir. Está aprobado para el tratamiento de la infección por VHC genotipo 1, combinado también con dasabuvir y, opcionalmente, con RBV. Sin dasabuvir, está aprobado para genotipo 4, también³⁴.

d) GRAZOPREVIR (GRZ)

Grazoprevir es un inhibidor de la proteasa que se administra coformulado con elbasvir. Está aprobado para genotipos 1a, 1b y 4³⁵.

e) GLECAPREVIR y VOXILAPREVIR (GCV y VOX)

Glecaprevir y Voxilaprevir son inhibidores de la proteasa viral, aprobados en nuestro país después del periodo de estudio de este trabajo (en noviembre de 2017), por lo que no han sido evaluados.

Son fármacos que se administran y están formulados en combinación; glecaprevir con pibrentasvir y, voxilaprevir con velpatasvir y sofosbuvir, respectivamente. Tienen como ventaja tener actividad frente a todos los genotipos, por lo que son considerados AADs pangenotípicos^{36,37}.

➤ **Inhibidores de la proteasa NS5A:**

a) DACLATASVIR (DCV)

Primer inhibidor de NS5A comercializado en nuestro país. Las recomendaciones de administración es conjuntamente con sofosbuvir con o sin RBV. Está aprobado para los genotipos 1, 3 y 4³⁸.

b) LEDIPASVIR (LDV)

Inhibidor de NS5A aprobado para los genotipos 1 y 4; en determinados casos también está autorizado para genotipo 3 aunque se ha comprobado que su actividad para este genotipo es limitada^{39,40}.

c) OMBITASVIR (OMB)

Inhibidor de NS5A formulado en conjunto con Paritaprevir (ritonavir), aprobado para genotipo 1 y 4. En genotipos 1, se añade también dasabuvir. Además, si esté recomendado y no es clínicamente incompatible, debe añadirse RBV.

d) **ELBASVIR (EBV)**

Inhibidor de NS5A formulado con glecaprevir. Aprobado en nuestro país para genotipos VHC 1 y 4.

e) **VELPATASVIR (VEL)**

Inhibidor de NS5A con alta barrera genética. Se administra combinado con sofosbuvir, con o sin RBV. Recientemente, se ha aprobado una nueva combinación con sofosbuvir y voxilaprevir. Esta última combinación suele reservarse para pacientes con fallo a tratamiento previo. Como SOF-VEL-VOX, ha sido aprobado tras el periodo del estudio, no ha sido evaluado en el análisis⁴¹.

f) **PIBRENTASVIR (PBV)**

Inhibidor de NS5A aprobado en combinación con glecaprevir. No evaluado en este estudio.

➤ **Inhibidores de la polimerasa viral NS5B:**

a) **SOFOSBUVIR (SOF)**

Primer inhibidor de NS5B aprobado en nuestro país. Es un fármaco muy potente y se caracteriza por ser pangénico y con una alta barrera genética. Actualmente, se utiliza en combinación con otros AADs. Antes de la aparición de combinaciones pangénicas, era una alternativa combinado con INF para los pacientes infectados por genotipo 3. Este régimen ha quedado relegado al considerarse subóptimo⁴².

b) DASABUVIR (DSV)

Es un inhibidor de la polimerasa viral no análogo de nucleósidos. Fármaco aprobado para genotipo 1, en combinación con paritaprevir(ritonavir) y ombitasvir, con o sin RBV.

DETECCION DE SARs Y SU IMPLICACION EN LA RVS

En ausencia de tratamiento antiviral, el VHC conduce a cirrosis, carcinoma hepatocelular (HCC), insuficiencia hepática y muerte. El tratamiento con antivirales de acción directa (AADs) es altamente eficaz y tiene efectos secundarios limitados. Las combinaciones actuales de AADs que se recomiendan como tratamiento de primera línea de los pacientes infectados por el VHC según las directrices AASLD-IDSA⁴³ y EASL⁴⁴, permiten alcanzar tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) prácticamente superiores al 90% para todos los genotipos del VHC.

Un tratamiento dirigido guiado por un informe de interpretación de SARs puede permitir alcanzar mejores tasas de eficacia⁴⁵⁻⁴⁸.

GUÍAS DE TRATAMIENTO FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Existen guías de tratamiento nacionales e internaciones para el manejo y tratamiento de la infección por VHC. A continuación, mostramos un resumen de las principales guías clínicas.

- Resumen de la guía clínica de tratamiento de la Asociación Española para el Estudio del Hígado – AEEH y la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (actualización de julio de 2018)⁴⁹

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

<i>Pacientes no cirróticos</i>					
Pacientes	Experiencia tratamiento previo	SOF/VEL	GLE/PIB	LDV/SOF	EBR/GZR
Gen 1a	naives	12 sem	8 sem	8-12 sem *	12 sem (RNA-VHC< 800.000 IU/ml)
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	No	12 sem (RNA-VHC< 800.000 IU/ml)
Gen 1b	naives	12 sem	8 sem	8-12 sem *	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	12 sem
Gen 2	naives	12 sem	8 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	No	No
Gen 3	naives	12 sem	8-12 sem **	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8-12 sem **	No	No
Gen 4	naives	12 sem	8 sem	12 sem	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No
Gen 5	naives	12 sem	8 sem	12 sem	No
	experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No
Gen 6	naives	12 sem	8 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No

*Los pacientes no cirróticos, con carga viral inferior a 6 millones UI/ml, pueden ser tratados por un periodo de 8 semanas

**En pacientes con mal pronóstico (F3 o presencia de SARs basales en NS3 o la A30K en NS5A) se recomienda alargar el tratamiento a 12 semanas

<i>Pacientes con cirrosis compensada</i>					
Pacientes	Experiencia tratamiento previo	SOF/VEL	GLE/PIB	LDV/SOF	EBR/RZR
Gen 1a	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12 sem (RNA-VHC< 800.000 IU/ml)
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	No	12 sem (RNA-VHC< 800.000 IU/ml)
Gen 1b	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12w
	experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	12w
Gen 2	naives	12 sem	12 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	No	No
Gen 3	naives	12 sem	12 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	16 sem	No	No
Gen 4	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No
Gen 5	naives	12 sem	12 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No
Gen 6	naives	12 sem	12 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No

En el caso de pacientes que han fallado a tratamiento previamente, propone las siguientes recomendaciones:

- Conocer el perfil de resistencias del paciente individual antes del retratamiento es útil, pero no imprescindible para realizarlo (BI)
- La combinación sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir durante 12 semanas está recomendada como terapia de rescate en todos los pacientes sin cirrosis o con cirrosis compensada que han fracasado a un tratamiento previo, con independencia del tipo de tratamiento o del genotipo (AI).
- En pacientes con cirrosis descompensada se puede utilizar la combinación Sofosbuvir/velpatasvir con Ribavirina durante 24 semanas(BII)
- La combinación sofosbuvir/glecaprevir/pibrentasvir debe ser reservada para casos excepcionales, como podría ser el rescate de pacientes que fallan a la combinación sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (CIII) o a glecaprevir/pibrentasvir(BII)

➤ Recomendaciones de tratamiento de la Sociedad Europea para el Estudio de Enfermedades del Hígado (EASL). Actualización del año 2018⁴⁴

Combinaciones de AADs aceptadas/recomendadas según genotipo; figura 9.

Genotype	Pangenotypic regimens			Genotype-specific regimens		
	SOF/VEL	GLE/PIB	SOF/VEL/VOX	SOF/LDV	GZR/EBR	OBV/PTV/r + DSV
Genotype 1a	Yes	Yes	No*	Yes*	Yes ^b	No
Genotype 1b	Yes	Yes	No*	Yes	Yes	Yes
Genotype 2	Yes	Yes	No*	No	No	No
Genotype 3	Yes ^c	Yes	Yes ^d	No	No	No
Genotype 4	Yes	Yes	No*	Yes*	Yes*	No
Genotype 5	Yes	Yes	No*	Yes*	No	No
Genotype 6	Yes	Yes	No*	Yes*	No	No

Figura 9: Combinaciones según genotipo

A continuación, se muestran unas tablas resumen de los tratamientos recomendados en función de genotipo y de la presencia o no de cirrosis. Figuras 10 y 11.

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

Patients	Prior treatment experience	SOF/VEL	GLE/PIB	SOF/VEL/VOX	SOF/LDV	GZR/EBR	OBV/PTV/r + DSV
Genotype 1a	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	8-12 wk	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	No	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
Genotype 1b	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	8-12 wk	8 wk (F0-F2) 12 wk (F3)	8 wk (F0-F2) 12 wk (F3)
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	12 wk	12 wk	12 wk
Genotype 2	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	No	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	No	No	No
Genotype 3	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	No	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	No	No
Genotype 4	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	12 wk	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	No	No	No
Genotype 5	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	12 wk	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	No	No	No
Genotype 6	Treatment-naïve	12 wk	8 wk	No	12 wk	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	8 wk	No	No	No	No

DAA, direct-acting antiviral; DSV, dasabuvir; EBR, elbasvir; GLE, glecaprevir; GZR, grazoprevir; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PIB, pibrentasvir; PTV, paritaprevir; r, ritonavir; SOF, sofosbuvir; VEL, velpatasvir; VOX: voxilaprevir.

Figura 10: Recomendaciones en pacientes sin cirrosis

Patients	Prior treatment experience	SOF/VEL	GLE/PIB	SOF/VEL/VOX	SOF/LDV	GZR/EBR	OBV/PTV/r + DSV
Genotype 1a	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	12 wk	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
Genotype 1b	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	12 wk	12 wk	12 wk
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	12 wk	12 wk	12 wk
Genotype 2	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	No	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	No	No
Genotype 3	Treatment-naïve	No	12 wk	12 wk	No	No	No
	Treatment-experienced	No	16 wk	12 wk	No	No	No
Genotype 4	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	12 wk	12 wk (HCV RNA ≤800,000 IU/ml)	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	No	No
Genotype 5	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	12 wk	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	No	No
Genotype 6	Treatment-naïve	12 wk	12 wk	No	12 wk	No	No
	Treatment-experienced	12 wk	12 wk	No	No	No	No

DAA, direct-acting antiviral; DSV, dasabuvir; EBR, elbasvir; GLE, glecaprevir; GZR, grazoprevir; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PIB, pibrentasvir; PTV, paritaprevir; r, ritonavir; SOF, sofosbuvir; VEL, velpatasvir; VOX: voxilaprevir.

Figura 11: Recomendaciones en pacientes cirróticos

- Guía de diagnóstico, manejo y tratamiento de los pacientes con hepatitis C de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado - AASLD⁴³

Las recomendaciones de la sociedad americana son equivalentes a las que se refieren en la EASL y en las guías de sociedades españolas.

➤ Guía de manejo de la Organización Mundial de la Salud

Según la OMS, en su guía del manejo y tratamiento de los pacientes con VHC, se recomiendan las siguientes directrices para iniciar tratamiento, tanto en adulto como en adolescentes⁵⁰, figura 12.

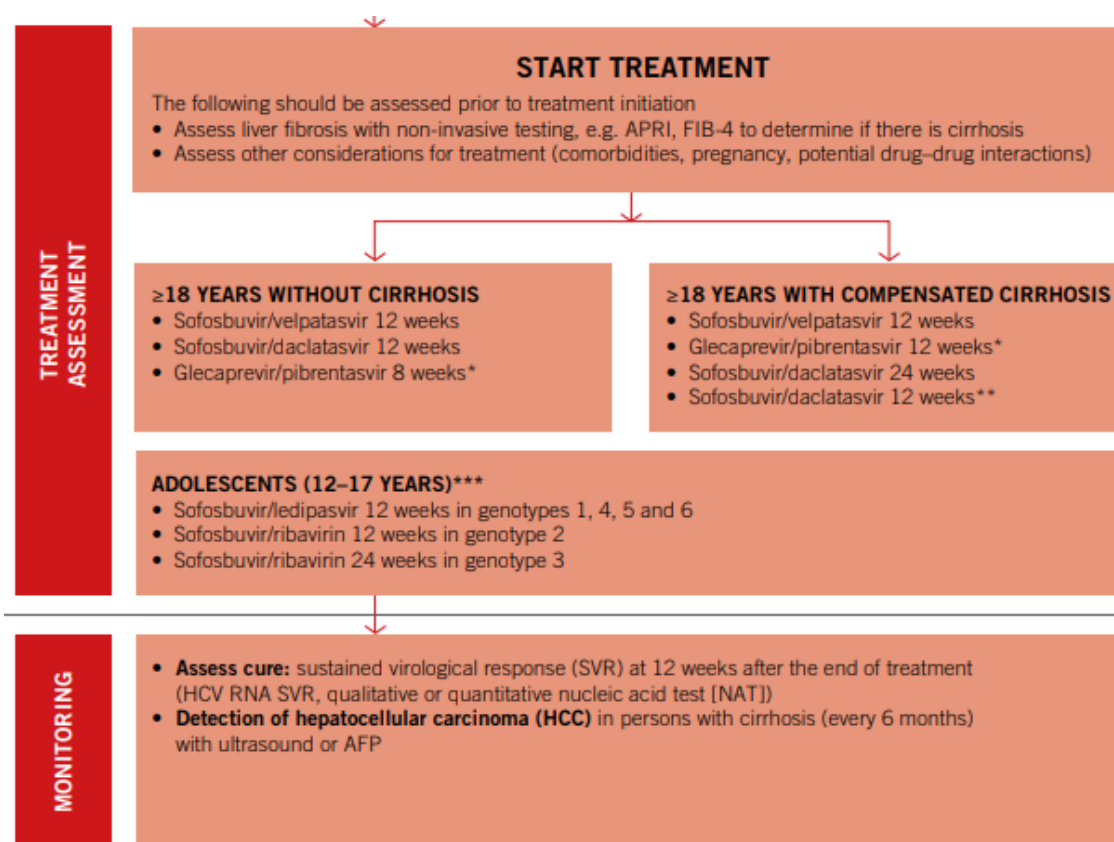


Figura 12: Recomendaciones generales de tratamiento y monitorización de los pacientes infectados por VHC.

*Pacientes con genotipo 3 que han estado expuesto a INF y/o RBV, deben seguir tratamiento durante 16 semanas.

**Pauta recomendada en países donde el genotipo 3 no sea altamente prevalente (<5%)

***El tratamiento en adolescentes requiere de genotipado antes de iniciar la terapia para que ésta sea la más apropiada

DOCUMENTO DE CONSENSO DEL GRUPO ESPAÑOL DE ESTUDIO DE LAS HEPATITIS VIRICAS (GEHEP). Actualización 2018

El grupo español de estudio de las hepatitis víricas (GEHEP) también ha publicado un documento de consenso con unas recomendaciones de tratamiento de los pacientes infectados por este virus. La última actualización de este documento se dio en 2018⁵¹. Un resumen de estas recomendaciones se muestran en las tablas 1 (para pacientes sin exposición previa a AADs) y 2 (pacientes ya tratados anteriormente con AADs).

Genotipo	Sin Cirrosis	Cirrosis Compensada
1a	EBR/GZR 12S (AI) ¹ GLE/PIB 8S (AI) SOF/VEL 12S (AI) LDV/SOF 8S (BI) ²	EBR/GZR 12 S (AI) ^{1,5} GLE/PIB 12 S (AI) ⁵ SOF/VEL 12 S (AI)
1b	EBR/GZR 12S (AI) GLE/PIB 8 S (AI) SOF/VEL 12 S (AI) LDV/SOF 8 S (BI)	EBR/GZR 12 S (AI) ⁵ GLE/PIB 12S (AI) ⁵ SOF/VEL 12 S (AI)
2	GLE/PIB 8 S (AI) SOF/VEL 12 S (AI)	GLE/PIB 12 S (AI) ⁵ SOF/VEL 12 S (AI)
3	GLE/PIB 12 S (AI) ² SOF/VEL 12 S (AI)	GLE/PIB 12 S (AI) ^{5,6} SOF/VEL 12 S (AI) ⁷
4	EBR/GZR 12 S (AI) ⁴ GLE/PIB 12 S (AI) SOF/VEL 12 S (AI)	EBR/GZR 12 S (AI) ⁵ GLE/PIB 12 S (AI) ⁵ SOF/VEL 12 S (AI)
5 y 6	GLE/PIB 8 S (AI) SOF/VEL 12 S (AI)	GLE/PIB 8 S (AI) ⁵ SOF/VEL 12 S (AI)

¹ Si menos de 800.000 UI/ml o en pacientes con >800.000 UI/ml, si hay constancia de la no existencia de sustituciones asociadas con resistencias a elbasvir

² En pacientes con F0-F2 y ausencia de RAS en NS3 y NS5A, la duración podrá ser de 8 semanas

³ Para ARN VHC <6.000.000 UI/ml. La pauta no sería recomendable en pacientes de etnia negra, ni con experiencia previa de tratamiento. En pacientes coinfectados por VIH/VHC no hay suficiente información sobre la eficacia de esta duración.

⁴ Si experiencia previa con PR se aconseja usar otra pauta de las recomendadas.

⁵ Sólo para pacientes en estadio Child-Pugh A

⁶ Si experiencia previa con PR la duración será de 16 semanas

⁷ Añadir RBV si hay resistencias en NS5A o no se dispone de esta información

Tabla 1: Recomendaciones de GEHEP para pacientes no expuestos a AADs

Genotipo	Sin Cirrosis	Cirrosis Compensada
1	SOF/VEL/VOX ¹ 12S AI GLE/PIB ² 12S BII SOF/VEL ³ 12S BII	SOF/VEL/VOX ^{1,4} 12S AI
2	SOF/VEL/VOX ¹ 12S AI GLE/PIB 12S BII SOF/VEL ⁴ 12S BII	SOF/VEL/VOX ⁴ 12S AI GLE/PIB ² 12S BII SOF/VEL ³ 12S BII
3	SOF/VEL/VOX 12S AI	SOF/VEL/VOX ⁴ 12S AI
4, 5 y 6	SOF/VEL/VOX 12S AI	SOF/VEL/VOX ⁴ 12S AI

¹Pauta universal de elección independientemente del esquema de AAD previo, especialmente ante fallos a NSSA.

²Solo si fallo previo a PR + NS3 o SOF +/- NS3, tanto en GT 1a como 1b.

³Solo si fallo previo a PR + NS3 (GT 1a y 1b) o SOF +/- NS3 (solo GT1b).

⁴Sólo si fallo a un régimen que no incluía un inhibidor de NSSA

⁵Sólo para pacientes en estadio Child-Pugh A

Tabla 2: Recomendaciones de GEHEP para pacientes que se han tratado con anterioridad con AADs

MEDIDAS PARA LA ERRADICACIÓN DEL VHC

En nuestro país, con la autorización de los nuevos AADs en pautas libres de INF que consiguen altas tasas de RVS, se puso en marcha en 2015 el Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) en el Sistema Nacional de Salud⁵².

El plan se elabora en 4 líneas estratégicas, estableciendo objetivos específicos y acciones prioritarias a desarrollar, en principio, entre 2015 y 2017.

Estos nuevos fármacos AADs, en pautas libres de INF, han permitido la simplificación del tratamiento, reducción de las visitas de seguimiento al disminuir enormemente los efectos adversos con este tipo de terapias, ha aumentado las tasas de curación y, por tanto, permite retrasar la aparición de complicaciones tardías y severas de la enfermedad.

El objetivo general es disminuir la morbimortalidad causada por el virus de la hepatitis C en la población española, abordando eficientemente la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de los pacientes.

Se resumen a continuación, las 4 líneas estratégicas:

- LINEA ESTRATÉGICA 1: Cuantificar la magnitud del problema, describir las características epidemiológicas de los pacientes con infección por virus de la hepatitis C y establecer las medidas de prevención.
- LINEA ESTRATÉGICA 2: Definir los criterios científico-clínicos que permitan establecer la adecuada estrategia terapéutica considerando el uso de antivirales de acción directa para el tratamiento de la hepatitis C en el ámbito del Sistema Nacional de Salud. Un resumen cronológico de los tratamientos disponibles a los largo de estos años se muestra en la figura 13.

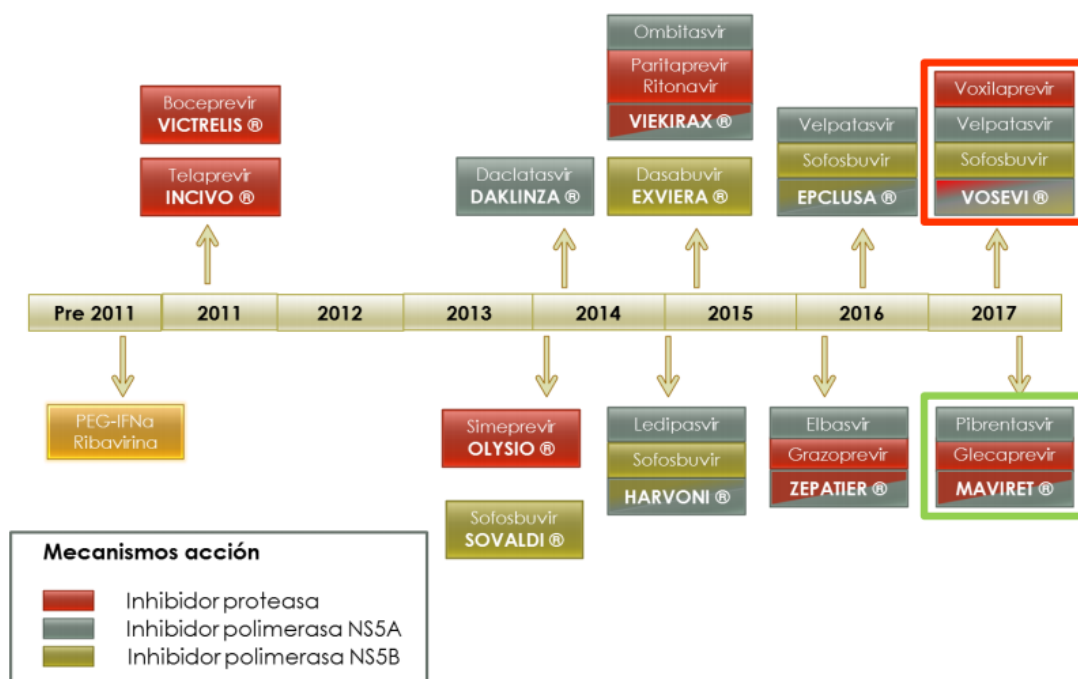


Figura 13: Resumen cronológico de los tratamientos disponibles frente al VHC

- LINEA ESTRATÉGICA 3: Establecer los mecanismos de coordinación para la adecuada implementación de la Estrategia para el abordaje de la hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud.
- LINEA ESTRATÉGICA 4: Fomentar el avance en el conocimiento de la prevención, diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud a través de actuaciones específicas en el área de la I+D+i.

En la actualización de este plan en octubre de 2018⁵³, se obtienen datos de pacientes tratados entre enero de 2015 y septiembre de 2018, que ascienden a más de 117.000 pacientes. En septiembre de 2018, hay un registro de pacientes basales (sin tratar) declarados de casi 67.000 pacientes. En cuanto al seguimiento de los enfermos, hay un registro de seguimiento terapéutico en la semana 12 post-tratamiento de 29.151 personas, habiendo conseguido RVS12 el 95,5% de ellas (tasa de fallos: 4,5%). Se pretende extender este plan hasta el año 2020.

A nivel internacional, también se están tomando medidas para conseguir el objetivo de erradicación del VHC^{54,55}.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

General:

Caracterizar los fallos virológicos de los pacientes que no alcanzaron RVS en la cohorte GEHEP-004 para conocer la dinámica de aparición y reversión de las variantes de resistencia en combinaciones libres de interferón.

Específicos:

- a) Proporcionar recomendaciones sobre la selección de un régimen de retratamiento
- b) Conocer la correcta asignación del subtipo mediante métodos comerciales de genotipado, en comparación con la secuenciación de las regiones NS5B, fundamentalmente, y NS3 y NS5A
- c) Estimar la introducción de cepas con polimorfismos que se puedan asociar a resistencia a los nuevos AADs en los últimos años
- d) Determinar el valor y el papel de la secuenciación masiva (UDS) en la detección de polimorfismos o mutaciones frente a los antivirales de acción directa así como en la detección de infecciones mixtas
- e) Analizar la eficacia de una primera línea de AADs con la información de las SARs basales detectadas
- f) Valorar el empleo de los métodos filogenéticos para distinguir entre recaídas y reinfecciones virales

JUSTIFICACIÓN

Las tasas de curación con las nuevas combinaciones de AADs son muy elevadas, pero existe un pequeño porcentaje de pacientes que no consiguen respuesta viral sostenida. Tanto los inhibidores de la proteasa como, en especial, los inhibidores de NS5A, que constituyen uno de los ejes centrales de los esquemas actuales del tratamiento, muestran una baja barrera genética a la resistencia. Conocer la dinámica de selección de variantes de resistencia a estas familias, y su persistencia en el tiempo, permitiría poder diseñar los mejores esquemas de rescate en estos pacientes. La correcta caracterización del geno/subtipo del VHC juega un papel cardinal en la selección del régimen de tratamiento. Emplear métodos de genotipado que sean capaces de discernir correctamente el genotipo que infecta al paciente, basados en la secuenciación de NS5B, puede ser de especial importancia para la elección del régimen de tratamiento.

Hay que tener en cuenta que la secuenciación utilizada en el estudio es secuenciación poblacional, capaz de detectar aquellas mutaciones que están presentes por encima del 20% con respecto a la población viral global que infecta al paciente. En determinados casos, no es posible discriminar si existe una determinada mutación en parte de esta población; cuando ésta es considerada de alto impacto como es el caso de la S282T en la región NS5B, debe recurrirse a la secuenciación masiva para descartarla, capaz de detectarlas en proporciones, incluso inferiores a 1% de la población viral. De la misma manera, en casos puntuales, puede darse discrepancias entre el genotipo detectado en distintas muestras de un mismo paciente o en distintas regiones y, para confirmar este genotipo y descartar una infección mixta en estos casos, se ha recurrido a esta tecnología.

No existen muchos datos publicados acerca del impacto de las SARs basales en la eficacia de tratamientos con AADs. Es por ello, que nos

planteamos determinar la prevalencia de las mismas en este grupo de pacientes y si detectábamos alguna con un impacto significativo o que se repitiera entre la población española.

Por último, nos planteamos estudiar en paralelo las muestras de pacientes que han fallado a una primera línea de tratamiento con AADs y una muestra basal (previa al tratamiento) que se tenga archivada, cuando ésta está disponible, con el fin de discriminar entre recidivas y reinfecciones virales. El empleo de métodos filogenéticos puede resultar de gran ayuda para esta discriminación, especialmente en aquellos casos en los que, por secuenciación, se detecta el mismo geno/subtipo en ambas muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE SARs

Estudio ambispectivo observacional, en el que se han estudiado muestras de pacientes que cumplen los criterios de inclusión, mediante secuenciación de poblaciones (Sanger) y, en algunos casos, secuenciación masiva.

Criterios de inclusión generales:

- Mayores de 18 años
- Infección crónica por cualquier genotipo del VHC, demostrada por la presencia de ARN-VHC detectable en plasma durante más de 6 meses.
- Específicos para el estudio de resistencias en pacientes tratados con AADs (fallos):
 - Haber iniciado un tratamiento que incluya una combinación con AADs libre de interferón y no haber alcanzado respuesta viral sostenida; considerando siempre que RVS es alcanzada si se superan las 12 semanas post-tratamiento con carga viral indetectable
 - Para los enfermos que inicialmente se incluyan con carácter retrospectivo, será necesario que se disponga de una muestra de archivo del momento del fracaso

- Específico para el estudio de resistencias basales:
 - No tener antecedentes previos de tratamientos con regímenes libres de interferón frente al VHC

Este estudio ha sido diseñado según la Declaración de Helsinki y evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio (anexo I). Todos los pacientes han dado su consentimiento informado escrito antes de ser incluidos en él (anexo II).

Para el estudio de detección de resistencias se ha creado un volante de petición que se ha facilitado a todos los facultativos participantes en el estudio, adjunto en el anexo III. Es fundamental conocer el estado virológico actual del paciente antes de iniciar el estudio, por lo que se solicita en dicho volante, la carga viral detectada en la muestra para detección de resistencias o, en su defecto, la última carga viral detectada sin haber habido tratamientos en ese intervalo y considerando que sea lo más cercana posible a la fecha de extracción de la muestra a estudio. Se recomienda que esta carga viral sea $\geq 3 \log_{10}$, para asegurar la amplificación del virus. También se solicita información del genotipado detectado en origen para evaluar las dianas a estudiar y la concordancia con el mismo.

Ámbito y periodo de estudio:

Este estudio es un estudio nacional, multicéntrico, formado por la cohorte GEHEP-004, de pacientes que han fallado a una primera línea de tratamiento con AADs libres de INF. En esta cohorte han participado 54 centros hospitalarios y 3 centros penitenciarios. La distribución de los centros

participantes a lo largo del territorio nacional se refleja en la figura 14. Todo el estudio ha sido coordinado desde el Hospital Universitario San Cecilio, en Granada.



Figura 14: Localización geográfica de los centros participantes

Como subestudio de la cohorte GEHEP-004, se ha invitado a los participantes de los centros que la integran a realizar la caracterización virológica basal de pacientes que no han estado previamente expuestos a AADs y que se plantean iniciar terapia. En este caso, han participado 22 de los 54 hospitales y uno de los centros penitenciarios. El genotipado inicial, previo a comenzar la terapia, se realizó en el centro de origen participante, con el ensayo que utilizan habitualmente. La carga viral en plasma se evaluó al inicio del estudio y, al menos, en la semana 12 después del tratamiento.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos, se ha considerado respuesta viral sostenida como la ausencia de ARN del VHC detectable en plasma a las 12 semanas después de finalizar la terapia.

En este proyecto, se han analizado las muestras de pacientes desde primeros de 2015 hasta octubre de 2017.

Variables consideradas:

Teniendo en cuenta los AADs comercializados en este periodo y, en función del genotipo del virus al que nos enfrentemos según la información proporcionada por el centro de origen, se ha realizado la detección de SARs en las regiones del genoma mostradas en la tabla 3:

GENOTIPO	NS3	NS5A	NS5B (si tratado previamente o genotipo en origen desconocido)
1 (1A/1B)	X	X	X
2		X	X
3 (3A)		X	X
4	X	X	X

Tabla 3: Regiones estudiadas en función del genotipo del virus.

En el caso de estudios de muestras basales (sin tratamiento previo con AADs), sólo se realizó el estudio de NS5B en aquellas muestras en las que se desconocía el genotipo en origen, se detectaba una discordancia con el genotipo informado en origen, o bien, se nos informaba de sospecha de reinfección y, en este caso, se estudiaba la muestra en paralela con la muestra obtenida tras un fallo a tratamiento (basal retrospectiva), como veremos más adelante.

Con el fin de alcanzar los objetivos del estudio, tanto para el estudio de detección de SARs en pacientes que fallaron a tratamiento con AADs como en aquellos que iban a iniciar una primera línea de tratamiento, se evaluaron variables primarias como polimorfismos basales y el genotipo, como variables de resistencia en las tres regiones así como su dinámica de reversión.

Además de estas variables, se recogieron las siguientes variables explicativas:

- Variables demográficas
- Variables relacionadas con la infección por el VHC
- Variables relacionadas con el tratamiento frente al VHC
- Otras variables clínicas y analíticas

Manejo, revisiones programadas y seguimiento de los pacientes:

El manejo general de los pacientes tratados con AADs se ha realizado de acuerdo con las recomendaciones de la AEMPS, las guías de práctica clínica y los paneles de expertos disponibles a lo largo de la ejecución del estudio.

Dentro del estudio, los pacientes han sido seguidos y evaluados hasta junio de 2018, habiendo en muchos casos iniciado e, incluso acabado, una segunda línea de tratamiento (rescate).

Una vez realizado el estudio de SARs de las diferentes regiones virales en el laboratorio, se emite un informe al clínico solicitante con la presencia de

las SARs detectadas y su interpretación realizada según el consenso de Lontok⁵⁶. Con el informe de SARs emitido y teniendo en cuenta la situación clínica del enfermo (comorbilidades, posibles interacciones con otros fármacos, etc), el médico responsable del paciente decide si iniciar o no retratamiento, con qué régimen y qué duración, en base a las recomendaciones que en ese momento dicte la AEMPS, el Plan Nacional de la hepatitis C y/o las recomendaciones de sociedades científicas.

Metodología de laboratorio:

Todas las muestras han sido procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio-PTS de Granada. La metodología utilizada es una adaptación de la publicada por Bartlett et al⁵⁷.

▪ *Tipo de muestra utilizada:*

Se ha utilizado plasma sanguíneo para los estudios de detección de SARs. El volumen mínimo requerido/recomendado ha sido de 1 mililitro.

▪ *Extracción de ácidos nucleicos:*

El primer paso en el laboratorio para la caracterización del virus es la extracción del material genético (RNA) mediante equipos automatizados; para ello, hemos utilizado MagNAPure (Roche[®]).

Este sistema es un equipo cerrado y automatizado con realización de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos a partir de partículas magnéticas.

▪ *Retrotranscripción:*

Una vez tenemos el ARN del VHC, procedemos a la síntesis de ADN mediante el sistema comercial (cDNA Sintesis ThermoScientific - Thermo Fisher Scientific®). El proceso consiste inicialmente en mezclar el RNA extraído con un oligo hexamérico aleatorio comercial en proporción (11:1), total 12 µl/muestra. Esta mezcla se lleva al termociclador a 65°C durante 5 minutos manteniéndose a 4°C pasado este tiempo.

A continuación, se realiza la retrotranscripción en sí; para ello se prepara una máster mix que contiene las siguientes proporciones mostradas en la tabla 4:

Reactivo	Volumen
Transcriptor transcriptasa reverse	0,5 µl
Tampón reacción de transcriptor transcriptasa reverse 5X	4 µl
Inhibidor RNAasa	0,5 µl
Mix dNTPs	2 µl

Tabla 4- Máster mix de la retrotranscripción

Seguidamente, se mezcla los 12 µl de ARN extraído + cebador hexamérico con 7 µl de la máster mix preparada y se lleva al termociclador con el siguiente programa de termociclado (tabla 5):

	Temperatura	Tiempo
1º)	25°C	10 min
2º)	50°C	60 min
3º)	85°C	5 min
4º)	4°C	∞

Tabla 5- Secuencia de termociclado para la retrotranscripción

Una vez finalizado este proceso ya tenemos el cDNA de cada muestra.

▪ *PCR-amplificación:*

Realizamos la amplificación de las distintas regiones del virus para su posterior secuenciación⁵⁷. Para cada región se utilizan oligonucleótidos genoespecíficos excepto para NS5B, donde se utilizan cebadores pangentotípicos comerciales. Para el estudio de detección de SARs frente a dasabuvir, los oligonucleótidos para NS5B utilizados fueron distintos; en este caso, genoespecíficos y que amplificaban una mayor región del gen con el fin de cubrir todas las posiciones asociadas a resistencia para este fármaco. Los cebadores utilizados para cada genotipo y región se muestran en la tabla 6:

Región-subtipo-F/R	Secuencia del cebador
Región NS3	
NS3-1A-F	GGAATGGTCTCCAAGGGGTGGA
NS3-1A-R	CATGGGCCTTGGACATGTAAGC
NS3-1B-F	ATGGARAYYAAGVTYATYACITGGG
NS3-1B-R	CTYTTICCRCTICCI GTIGGIGCRTG
NS3-4A-F	GCCAAATGGyCGTGCTTAAA
NS3-4A-R	AGTGAACACTGGTGGTGAYCTCATRG
NS3-4D-F	GGyAGAGACACCAAyGAGAA
NS3-4D-R	GTTTAGCACYAGCACTTTGTAG
Región NS5A	
NS5A-1A-F	TCCTGGYTRAGGGACATCT
NS5A-1A-R	CCGTGGTGTAGGCRTRAT
NS5A-1B-F	GGGATGTTTGGGACTGGATATG
NS5A-1B-R	GRTTGAGCCCGACCTGAAATG
NS5A-3A-F	CyGCATTGCTGAGTTCTCTA
NS5A-3A-R	GYAGTCTCACYCCATCCACTTC
NS5A-4-F	CTCAGACGCCTCCACAAGTG
NS5A-4-R	GTGWGATGGRTCTGT CARCATRGATG
Región NS5B	
NS5B-Univ-F	CNTAYGAYACCMGNTGYTTTGACTC
NS5B-Univ-R	TTNGADGAGCADGATGTWATBAGCTC

Tabla 6: Cebadores utilizados en la amplificación de dianas [F: forward; R: reverse; Univ: universal]

Para la amplificación de la región NS5B del virus (la cual también utilizamos para el regentipado de las muestras) se utiliza la siguiente máster mix con las proporciones mostradas en la tabla 7, por muestra.

Reactivo	Volumen
Agua ultrapura	12 µl
Tampón 10X	2,5 µl
Cloruro magnésico	1,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Cebador NS5B-forward	1,5 µl
Cebador NS5B-reverse	1,5 µl
DNA polimerasa	0,5 µl

Tabla 7- Máster mix para la amplificación de NS5B

Una vez tenemos la máster mix preparada, mezclamos 20 µl de la misma con 5 µl del cDNA de cada muestra y le aplicamos el siguiente programa en los casos de fallos a pautas que no incluían dasabuvir para llevar a cabo la amplificación en sí (tabla 8):

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	95°C	2 min	1
2º)	94°C	20 seg	
3º)	56°C	30 seg	45
4º)	72°C	1 min	
5º)	72°C	10 min	1
6º)	4°C	∞	

Tabla 8- Secuencia de termociclado para la amplificación de NS5B en fallos que no incluían dasabuvir

En los casos de fallos a pautas que incluían dasabuvir, el protocolo de amplificación sería el mostrado en la tabla 9.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	95°C	2 min	1
2º)	94°C	20 seg	45
3º)	58°C	30 seg	
4º)	72°C	1 min	
5º)	72°C	10 min	1
6º)	4°C	∞	

Tabla 9- Secuencia de termociclado para la amplificación de NS5B en fallos a alguna combinación con dasabuvir

Para la amplificación de la región NS5A del virus se utiliza la siguiente máster mix que incluye los pertinentes oligonucleótidos genoespecíficos con volúmenes por muestra mostrados en la siguiente tabla (tabla 10):

Reactivo	Volumen
Agua ultrapura	12 µl
Tampón 10X	2,5 µl
Cloruro magnésico	1,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Cebador genoespecífico NS5A-forward 10µM	1,5 µl
Cebador genoespecífico NS5A-reverse 10µM	1,5 µl
DNA polimerasa	0,5 µl

Tabla 10- Máster mix para la amplificación de NS5A

Una vez tenemos la máster mix preparada, mezclamos 20 µl de la misma con 5 µl del cDNA de cada muestra y le aplicamos el siguiente protocolo de amplificación (tabla 11):

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	94°C	3 min	1
2º)	94°C	30 seg	
3º)	60°C	30 seg	35
4º)	72°C	45 seg	
5º)	72°C	5 min	1
6º)	4°C	∞	

Tabla 11- Secuencia de termociclado para la amplificación de NS5A

Por último, para la amplificación de la región NS3 del virus se utiliza la siguiente máster mix que incluye los pertinentes oligonucleótidos genoespecíficos con volúmenes por muestra mostrados en la tabla 12:

Reactivo	Volumen
Agua ultrapura	12 µl
Tampón 10X	2,5 µl
Cloruro magnésico	1,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Cebador genoespecífico NS3-forward 10µM	1,5 µl
Cebador genoespecífico NS3-reverse 10µM	1,5 µl
DNA polimerasa	0,5 µl

Tabla 12- Máster mix para la amplificación de NS3

Una vez tenemos la máster mix preparada, mezclamos 20 µl de la misma con 5 µl del cDNA de cada muestra y, según el genotipo, le aplicamos un protocolo de amplificación distinto. Para muestras con genotipo 1a, 4a ó 4d, se aplica el protocolo mostrado en la tabla 13 y para muestras con genotipo 1b, se aplica el mostrado en la tabla 14.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	94°C	3 min	1
2º)	94°C	1 min	
3º)	58°C	1 min	43
4º)	72°C	70 seg	
5º)	72°C	5 min	1
6º)	4°C	∞	

Tabla 13- Secuencia de termociclado para la amplificación de NS3 genotipos 1a, 4a ó 4d

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	94°C	3 min	1
2º)	94°C	30 seg	
3º)	60°C	30 seg	35
4º)	72°C	45 seg	
5º)	72°C	5 min	1
6º)	4°C	∞	

Tabla 14- Secuencia de termociclado para la amplificación de NS3 genotipo 1b

Para comprobar la amplificación de las muestras se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

▪ *Purificación del producto de PCR:*

Una vez tenemos las 3 regiones amplificadas, se procede a la purificación de los productos de amplificación antes de realizar la secuenciación Sanger. Esta purificación la hacemos de manera enzimática mediante un kit comercial llamado Illustra ExoStar[®], consistente en una exonucleasa. Para ello, mezclamos 5 µl del producto de PCR con 2 µl de exonucleasa y lo pasamos al termociclador con el siguiente protocolo (tabla 15):

	Temperatura	Tiempo
1º)	37°C	2 min
2º)	37°C	15 min
3º)	80°C	15 min
4º)	4°C	∞

Tabla 15- Protocolo de purificación del producto de amplificación

Los productos de amplificación purificados se cuantifican mediante el equipo NanoDrop® según indicaciones del fabricante.

▪ *Secuenciación poblacional:*

La secuenciación de las regiones del virus la hemos realizado mediante el analizador ABI Prism 3500 (Applied BioSystems – ThermoFisher Scientific®) – figura 15. Para llevar a cabo este proceso, se ha realizado una PCR de secuenciación ajustando la cantidad de producto purificado de amplificación con la que trabajamos; para estas muestras, realizamos diluciones de estos productos hasta 12-16µg de cDNA/pocillo a partir de los valores obtenidos por NanoDrop®.



Figura 15: Secuenciador poblacional ABI-3500

La máster mix para la PCR de secuenciación se muestra en la tabla 16:

Reactivo	Volumen
Agua ultrapura	2,5 µl
Tampón de secuenciación	1,0 µl
Reactivo BigDye 3.1	2,0 µl
Cebador forward/reverse	0,5 µl

Tabla 16- Máster mix para la PCR de secuenciación

Para cada muestra, mezclamos los 6 µl de la máster mix con 4 µl del producto diluido y purificado de amplificación y lo llevamos al termociclador con el protocolo mostrado en la tabla 17.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1º)	96°C	1 min	1
2º)	96°C	10 seg	
3º)	50°C	5 seg	25
4º)	60°C	2 min	
5º)	4°C	7 min	1
6º)	4°C	∞	1

Tabla 17- Protocolo de la reacción de secuenciación

El producto de la reacción de secuenciación se debe purificar antes de realizar la secuenciación en sí en el equipo. Esta purificación se realiza a partir de un kit comercial llamado X-Terminator (ThermoFisher Scientific®). La secuenciación capilar en el equipo se realiza según protocolo. En la figura 16 se muestra el interior del equipo de secuenciación.

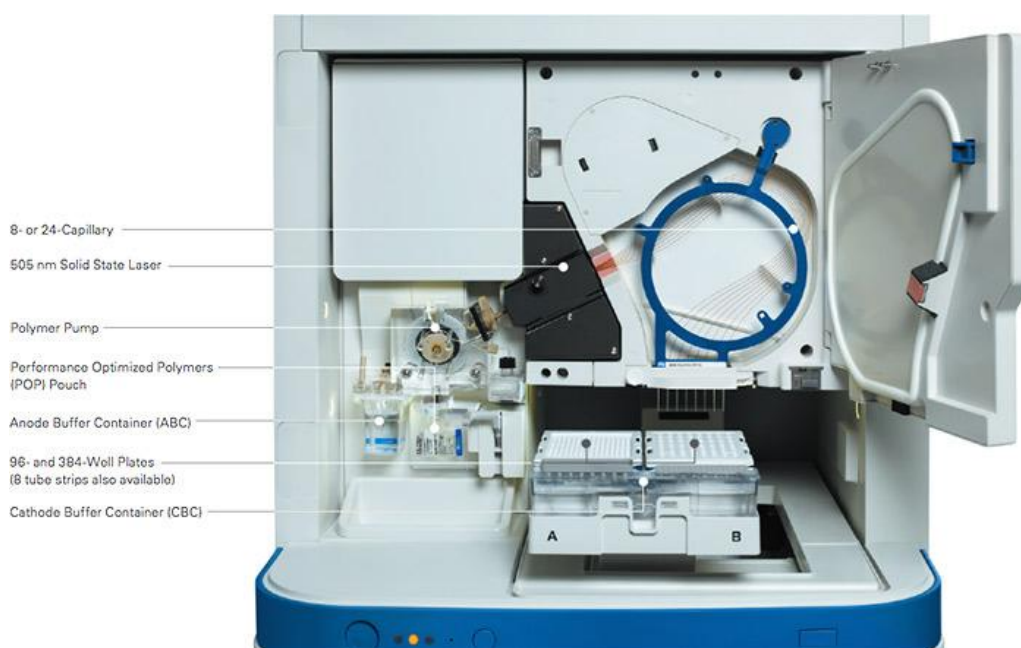


Figura 16: Interior del equipo secuenciador utilizado

▪ *Lectura de secuencias e interpretación de las mutaciones*

Una vez secuenciadas las regiones, se analizaron y evaluaron los cambios producidos en las posiciones asociadas a resistencia para cada fármaco.

La amplitud de las regiones secuenciadas ha sido la siguiente:

- El fragmento de gen NS5B secuenciado ha abarcado un fragmento de 388 pb para aquellos pacientes tratados con sofosbuvir, considerando cambios en posiciones de la 220 a la 360. Ha sido de especial relevancia la detección de cambios en la posición 282, sobretodo S282T. En aquellos pacientes tratados con dasabuvir, para poder evaluar todas las posiciones de interés, se han requerido otros cebadores genoespecíficos (pacientes infectados con GT-1A o GT-1B), permitiendo el estudio de cambios en posiciones desde la 220 a la 570.

- En el fragmento de gen de NS5A se secuenciaron amplicones incluyendo posiciones de la 17 a la 95, entre las que se encuentran las descritas como SARs.
- Por otro lado, en el gen de la proteasa NS3, se evaluaron todos los cambios abarcados entre las posiciones 10 a la 181.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo a través del programa Chromas v.2.4.4. Un ejemplo de SARs detectada en NS5A se muestra en la figura 17.

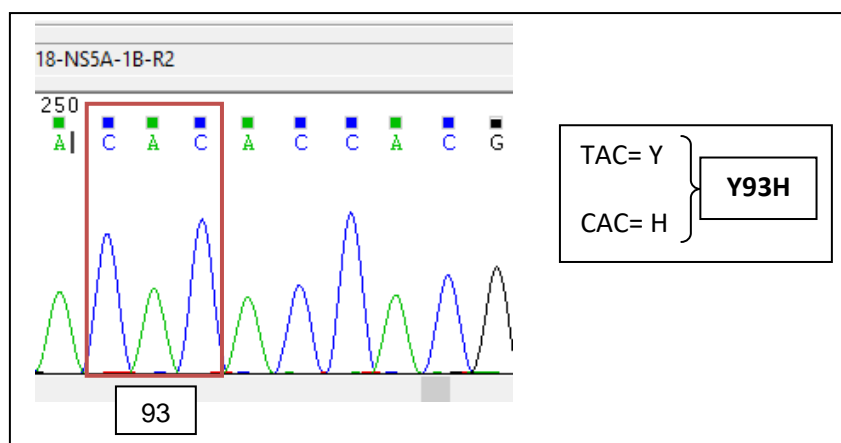


Figura 17: Ejemplo de SAR detectada en NS5A

Tanto para el alineamiento de las secuencias como para la identificación de cambios se ha utilizado la herramienta bioinformática geno2pheno v.0.92^{58,59}.

Una vez realizado el estudio de SARs de las diferentes regiones virales según el consenso de Lontok⁵⁶, se emite el informe al clínico con la información del impacto de las mismas sobre la actividad de los fármacos aprobados en ese momento. Un resumen de las mutaciones descritas en el consenso de Lontok⁵⁶ se refleja en la figura 18.

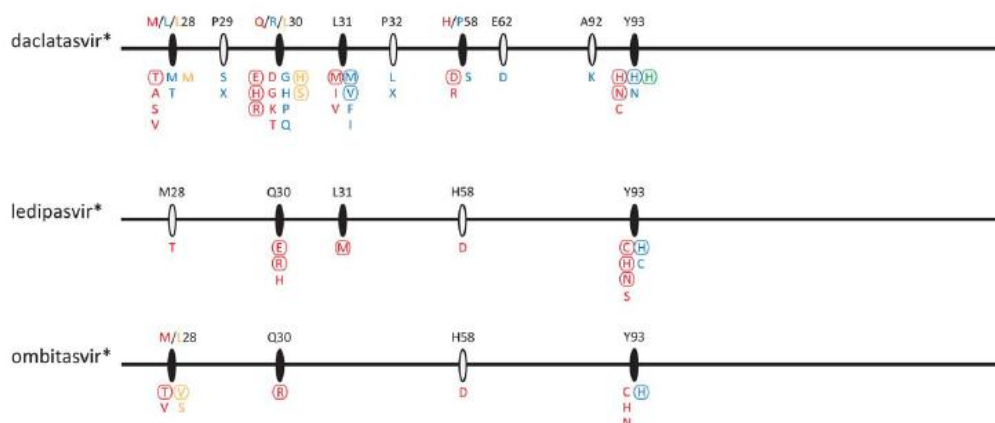
NS5B Polymerase (591 aa) - Nucleotide Analog



NS5B Polymerase (591 aa) - Non-nucleoside Analog



NS5A Domain 1 (213 aa)



NS3 Protease (180 aa)

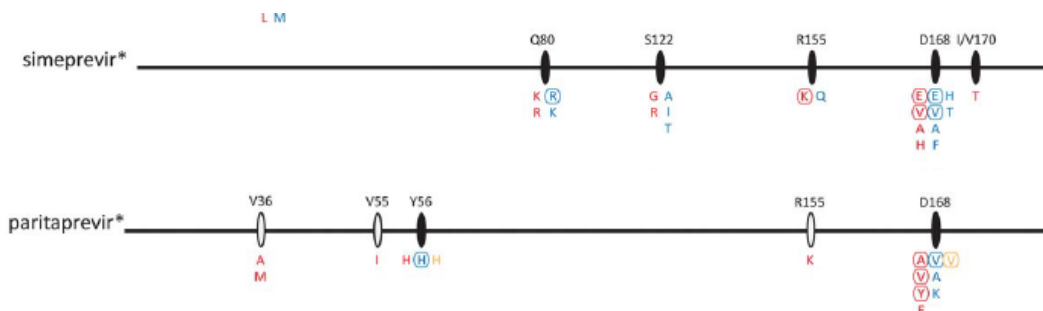


Figura 18- Algoritmo de interpretación según fármaco (Consenso de Lontok)

En el caso del estudio de resistencias basales; en NS5A, cuando éstas estaban presentes, aparte de informarse las SARs consideradas en el consenso de Lontok⁵⁶, se analizaron también cambios específicos para elbasvir descritos⁴⁴, como 28A/G/T, 30D/E/H/G/K/L/R, 31F/M/V y

93C/H/N/S. También se analizaron las SARs específicas en NS5A para velpatasvir, como 30K, 31M/P/V, 92K y 93H/N/R.

La determinación del genotipo a partir de la región NS5B, también se obtiene mediante la herramienta geno2pheno¹¹. Para la confirmación del genotipo, hemos utilizado otras plataformas como 'Oxford HCV-Subtyping Tool'⁶⁰ ó Comet⁶¹.

▪ *Secuenciación masiva de NS3/4A, NS5A y NS5B:*

Se realiza la extracción de ARN a partir de 1 ml de plasma previamente concentrado en sistemas automatizados o kits comerciales basados en columnas para las muestras con cargas virales menores de 5000 copias/ml. Posteriormente se realiza una RT-PCR específica empleando un cebador de fusión con adaptadores para librerías A. Tras la cuantificación (picogreen/nanodrop) y purificación (Ampure) se prepararán librerías de $10e^9$ moléculas de amplicones. Estas moléculas se amplifican mediante emPCR y se secuencian mediante pirosecuenciación con la tecnología GS Junior+ (Roche), según protocolo. Las secuencias obtenidas se analizan con el software AVA (Roche) y también mediante algoritmos alternativos, basados en filtrados de calidad de los archivos de imagen tras la pirosecuenciación y posterior filtrado genético de los archivos de salida fastq (GS Mapper). Las secuencias fasta son cargadas en el servidor DeepChek para analizar las variantes minoritarias según el límite de detección elegido. Se establece el 1% como límite de sensibilidad para variantes minoritarias de secuenciación masiva, por lo que todas las secuencias que representen menos del 1% no se considerarán en primera instancia para los análisis. La reproducibilidad de la secuenciación masiva se realiza utilizando controles de clones moleculares para cada una de las

regiones del VHC a estudiar. Esta tecnología (GS Junior+) se ha utilizado hasta finales de 2016; posteriormente, hubo un cambio de plataforma a Illumina MiSeq[®] (Thermofisher), utilizando una adaptación del protocolo descrito por Quer et al⁶².

Análisis de datos:

Para el registro y posterior análisis de los datos se ha utilizado el programa estadístico IBM-SPSS v.22.

La estadística descriptiva ha sido utilizada para todas las variables del estudio. Las variables categóricas se resumen mediante distribución de frecuencias absolutas y relativas. Cuando ha sido apropiado se han resumido las medidas de asociación mediante riesgos relativos, odds ratios y sus intervalos de confianza. Para las variables continuas se presentara el número de observaciones válidas así como estadísticos que describan el promedio y la distribución de la distribución (media \pm desviación estándar). Para el análisis estadístico que compara y relaciona las variables principales y secundarias ha hecho falta una amplia variedad de técnicas estadísticas, elegidas en función del número y naturaleza de las variables a relacionar.

El objetivo de tamaño muestral mínimo calculado para conseguir datos robustos con una potencia del 80% y un nivel de significación del 5%, se consideró que serían, antes de iniciar el estudio, de 150 muestras (fallos a tratamiento).

MATERIAL Y MÉTODOS DEL ESTUDIO DE REINFECCIONES vs RECIDIVAS

Ámbito y pacientes incluidos:

A partir de los pacientes pertenecientes a la cohorte multicéntrica GEHEP-004, para el estudio de diferenciación entre reinfecciones y recidivas, se hizo un corte con 53 pacientes de los cuales disponíamos de muestra basal (previa al tratamiento con AADs) y muestra del momento del fallo. Lo que hicimos en estos casos, fue un estudio en paralelo de las muestras de estos pacientes, que fueron tratados entre los años 2014 y 2016 con regímenes estándar de AADs disponibles en ese momento en nuestro país. En concreto, los regímenes de AADs a los que fallaron los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 18.

Régimen de AADs al que han fallado	n	%
Sofosbuvir/ledipasvir±RBV	20	37,7%
Paritaprevir_(ritonavir)/ombitasvir/dasabuvir±RBV	11	20,8%
Sofosbuvir/daclatasvir±RBV	8	15,1%
Sofosbuvir/simeprevir±RBV	5	9,4%
Paritaprevir_(ritonavir)/ombitasvir±RBV	2	3,8%
Otras combinaciones	7	13,2%

Tabla 18: Distribución de regímenes fallados

Respecto al genotipo, no hubieron discriminaciones al considerar a los pacientes para este estudio. Todos ellos, tenían carga viral indetectable en el momento final del tratamiento pero se detectó en la revisión de las 12 semanas post-tratamiento (momento de valoración de eficacia de tratamiento: RVS).

Amplificación y secuenciación genética:

La amplificación y secuenciación de las regiones NS3, NS5A y NS5B, según el caso, se llevó a cabo exactamente igual que en el resto de pacientes de la cohorte; descrito anteriormente. Como mínimo, fueron secuenciadas dos regiones en prácticamente todos los casos.

Para aquellos casos que resultaron reinfecciones, se llevó a cabo secuenciación masiva (NGS), empezando por la muestra basal y viendo la evolución virológica del paciente hasta el momento del fallo para descartar tuviéramos casos de infección mixta.

Hasta finales de 2016, se utilizó la plataforma de pirosecuenciación GS-454 Junior[®] (Roche) según protocolo. Posteriormente, hubo un cambio de plataforma a Illumina MiSeq[®] (Thermofisher), utilizando una adaptación del protocolo descrito por Quer et al⁶².

Toda la metodología experimental de amplificación y secuenciación (tanto poblacional como masiva) se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio.

Todas las secuencias generadas en este estudio han sido enviadas a Genbank (números de acceso MG983221-MG983474).

Determinación del genotipo/subtipo del VHC y/o recombinación genotípica:

En los centros de origen de los pacientes, la determinación del genotipo ha sido realizada mayoritariamente con el ensayo comercial Versant HCV Genotype v.2.0 (LiPA) -86,8% de los pacientes-, seguido del ensayo Abbott Real Time HCV Genotype II (9,4%) y del Trugene HCV Genotyping Kit (3,8%), respectivamente.

Tanto el genotipo como el subtipo de las muestras ha sido comprobada por análisis filogenético manual y el uso de herramientas de determinación de genotipo como las descritas anteriormente para el resto de muestras^{60,61}.

En aquellos casos en los que hubo discordancias entre las diferentes herramientas, se utilizó la herramienta Simplot para discriminar recombinaciones genotípicas^{63,64}.

Manejo de datos y valoración de recombinación intrasubtipo:

A partir de la herramienta bioinformática BLAST^{65,66}, se obtuvieron las diez secuencias más similares a cada una de las de los 53 pacientes estudiados.

Las secuencias analizadas fueron las resultantes del concatenado de las secuencias obtenidas de cada región. La finalidad del concatenado y, por lo tanto, aumento de la longitud de fragmento genómica no era otro que aumentar

la señal filogenética. Estas secuencias fueron alineadas y editadas manualmente para asegurar una alta calidad, utilizando las herramientas Seaview[®] y MEGA v.7.0^{®67,68}. Un análisis más extenso de recombinación se realizó usando RDP4 y TreePuzzle^{69,70}. El análisis de mapeo-similitud con TreePuzzle fue utilizado para evaluar el porcentaje de conflicto respecto a la señal filogenética. En cuanto a la posibilidad de recombinación potencial indicada por RDP4, ésta se confirmaba únicamente si 2 secuencias parentales eran identificadas y los puntos de corte eran significativos. Debido a esto y, dependiendo de las cepas (secuencias) incluídas en el análisis, debemos tener en cuenta que una ausencia de evidencia de recombinación intrasubtipo no tiene porque ser igual a evidencia de ausencia de recombinación intrasubtipo.

Metodología del análisis filogenético:

El correcto alineamiento de codones fueron llevados a cabo mediante aproximaciones a partir del método de neighbour-joining (NJ) y de máxima verosimilitud (ML), aplicando el modelo GTR-gamma. La evaluación de robustez del árbol generado se evaluó con 1000 réplicas de *bootstrap*.

A partir de la aproximación con NJ, los árboles resultantes fueron inferidos en MEGA v.7.0, mientras para la de ML, los árboles se construyeron utilizando FastTree y RAxML⁷¹. Además, tiene en cuenta las posiciones de RASs para que no interfieran en la inferencia de la topología de los árboles resultantes.

Cuando se hace el comparativo entre las muestras basales y tras el fallo en el mismo paciente, se consideró como evidencia de reinfección cuando

hubo una diferencia entre el genotipo o subtipo detectado en ambas muestras, o bien, cuando se detectaron en distintos clados dentro del árbol filogenético. Por otro lado, una evidencia de recidiva viral se definió cuando ambas muestras pareadas del mismo paciente resultaron dentro del mismo clado en el árbol filogenético. En estos pacientes, el valor de *bootstrap* más bajo resultante fue del 83%. Por último, se consideraron casos en los que filogenéticamente no se pudo establecer evidencia de la situación, aquellos en los que el valor *bootstrap* era <70%, teniendo distancias filogenéticas mayores.

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN VIROLÓGICA DE LOS PACIENTES QUE HAN FALLADO A REGÍMENES CON ALGÚN INHIBIDOR DE NS5A

Características clínico-epidemiológicas de los pacientes:

Los pacientes que fallaron un inhibidor de NS5A en la cohorte GEHEP-004 fueron principalmente hombres (85,7%). La edad media de estos pacientes fue de 53 años (rango intercuartílico [RIC]: 48-58). La carga viral media en el momento del fallo fue de 5,82 log₁₀ copias de ARN del VHC por mililitro (RIC: 5,34-6,42). Un total de 137 pacientes de un total de 281 (48,8%) eran cirróticos (habiéndose considerado como cirróticos aquellos con un grado de fibrosis >12,5 kPa). Ciento venticinco pacientes de 261 (47,9%) habían estado expuestos previamente a regímenes que contenían IFN y un total de 119 pacientes de 287 (41,5) estaban coinfectados por el VIH.

El genotipado de las muestras secuenciadas se realizó a partir de la secuenciación de NS5B de los 342 pacientes. En la distribución de los genotipos en esta cohorte de fallos a tratamiento, resultó predominante el genotipo 1 (tanto 1a como 1b), seguido del genotipo 3. no resultó muy dispar respecto a la prevalencia por genotipos descrita en nuestro país en la población en general¹⁸, ni en la descrita en otros países⁷², siendo el genotipo 1 el predominante. En la siguiente tabla (tabla 19) se muestran las características demográficas, clínicas y virológicas de la población que hemos estudiado. En dicha tabla, quedan reflejados los diferentes regímenes de primera línea a los que han fallado los pacientes. En esta distribución de regímenes y en el análisis que puede verse a continuación para cada pauta, se han excluido 20 casos debido a haberse detectado un cambio a nivel de genotipo desde el genotipo basal informado en origen y el genotipo obtenido por la secuenciación

de NS5B en el momento del fallo. En 5 de estos 20 casos, se realizó un estudio de muestras pareadas 'basal-fallo', confirmándose la reinfección, aunque no se dispuso de muestras basales para los otros 15 casos con el fin de descartar un error de genotipado basal frente a una posible reinfección; es por ello, que el análisis se ha realizado sobre un total de 322 pacientes.

Características epidemiológicas	
Población a estudio (n)	342
Sexo (varones)	85,7%
Edad (años): n; (RIC)	53; (48-58)
Características clínicas	
Carga viral (log₁₀): media; (RIC)	5,82; (5,34-6,42)
Genotipo: n; %	
<i>Genotipo 1a</i>	126; 36,8%
<i>Genotipo 1b</i>	78; 22,8%
<i>Genotipo 3a</i>	83; 24,3%
<i>Genotipo 4a</i>	10; 2,9%
<i>Genotipo 4d</i>	44; 12,9%
<i>Genotipo 4t</i>	1; 0,3%
Expuestos previamente a IFN	125/261 (47,9%)
Cirrosis (>12,5 Kpa)	137/281 (48,8%)
Coinfectado con VIH	119/287 (41,5%)
Régimen fallado*	
SOF-LDV	118; (36,7%)
SOF-LDV+RBV	56; (17,4%)
SOF-DCV	52; (16,1%)
SOF-DCV+RBV	25; (7,8%)
PrO/PrOD	33; (10,2%)
PrO/PrOD±RBV	29; (9,0%)
Otros regímenes	9; (2,8%)

* Veinte casos se han excluido debido a un cambio en el genotipo reportado desde el inicio hasta el genotipo NS5B en el momento del fallo. El estudio de muestras pareadas con muestra basal y del fallo confirmó la reinfección en 5 de estos 20 casos. No hubo muestras basales disponibles para los otros 15 casos para descartar un error de genotipado basal o una reinfección.

RIC: Rango intercuartílico; IFN: interferón; SOF: sofosbuvir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; Pr: paritaprevir_(ritonavir); O: ombitasvir; D: dasabuvir.

Tabla 19: Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes

En la tabla siguiente, vemos el total de discrepancias que detectamos en cuanto a geno/subtipo entre el informado en el centro de origen y el obtenido por secuenciación (tabla 20). Como se ha mencionado anteriormente, únicamente se han excluido del análisis de SARs, 20 casos en los que se detecta un cambio a nivel de genotipo, al considerarse éste una probable reinfección. En el resto de casos, cambios a nivel de subtipo, hemos decidido no eliminarlos del análisis, pues no podemos asegurar que se traten de errores de genotipado.

Número de casos	Genotipo basal (informado por el clínico)	Genotipo del fallo (detectado por secuenciación)
1	1	3a
2	1a	1b
3	1a	3a
1	1a	4d
18	1b	1a
3	1b	3a
1	1b	4a
1	1b	4d
1	3a	1a
1	3a	4a
6	4	1a
1	4	3a
1	4b	4a
1	4c	4d
1	5	1a

Tabla 20: Total de discrepancias detectadas en el geno/subtipo

Fallos a regímenes basados en sofosbuvir-ledipasvir

La mayoría de los pacientes (n = 174; 54,0%) en la cohorte habían fallado sofosbuvir/ledipasvir con o sin ribavirina. Más de la mitad de estos pacientes fueron infectados con el genotipo 1 (34,5% GT1a; 29,3% GT1b), mientras que sólo el 13,2% de ellos estaban infectados con el genotipo 3. Justamente resultó el genotipo 3 el menos propenso a desarrollar SARs en

NS5A (sólo el 17,4% de estos enfermos). Cabe destacar que casi todos los pacientes infectados con el genotipo 1b que fracasaron a sofosbuvir/ledipasvir desarrollaron SARs (94,1%). Los genotipos 1a y 1b albergaban SARs en NS3 en el momento del fallo en el 6,3% de los pacientes. Curiosamente, la SAR S282T en NS5B, sólo se seleccionó en tres pacientes (1,7%); todos ellos infectados por GT-4. Estos hallazgos se resumen en la tabla 21.

Genotipo (%)	% SARs (totales)	% SARs por diana
1a (34,5%)	73,3%	5,0% NS3 56,7% NS5A 11,6% NS5A+NS3
1b (29,3%)	94,1%	94,1% NS5A
3a (13,2%)	17,4%	17,4% NS5A (Y93H)
4 (23,0%)	32,5%	25,0% NS5A 7,5% NS5B(S282T)+NS5A

Tabla 21: Prevalencia de SARs detectadas por región en los pacientes que han fallado a un régimen basado en sofosbuvir/ledipasvir

Al margen del estudio de SARs realizado sobre los pacientes que han fallado a una primera línea de tratamiento, como se ha descrito en la metodología, se ha realizado un seguimiento de los pacientes hasta el primer semestre de 2018. Teniendo en cuenta que Vosevi® (sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir) no fue aprobado en España hasta diciembre de 2017, cuando ha tenido lugar el retratamiento de los pacientes estudiados con una segunda línea, ha sido nuevamente con regímenes convencionales.

De los 174 fallos registrados a una primera línea con un régimen basado en sofosbuvir/ledipasvir, 107 pacientes (61,5%) fueron retratados con regímenes convencionales. De estos 107 enfermos que inician un retratamiento

(2ª línea), el 52,2% eran cirróticos, por lo que prevalecía el inicio de una nueva pauta de rescate sobre la espera de nuevas combinaciones terapéuticas.

Del total de pacientes que inician terapia de rescate, cuatro enfermos fueron considerados pérdida de seguimiento y, hasta el momento del análisis de los datos y fin de seguimiento, 101 fueron evaluados para RVS a las 12 semanas después de finalizar la terapia (RVS12). De estos 101, 89 pacientes habían conseguido la eliminación de la infección por VHC. En un enfoque modificado de intención de tratar, que excluye a todos los pacientes que no fueron evaluables en la RVS12 debido a diversas razones, la eficacia del tratamiento de rescate con regímenes convencionales, guiado por resistencias, para los pacientes que fallaron a una primera línea de sofosbuvir/ledipasvir±ribavirina fue del 88,1%. El seguimiento de estos pacientes se muestra gráficamente en la figura 19.

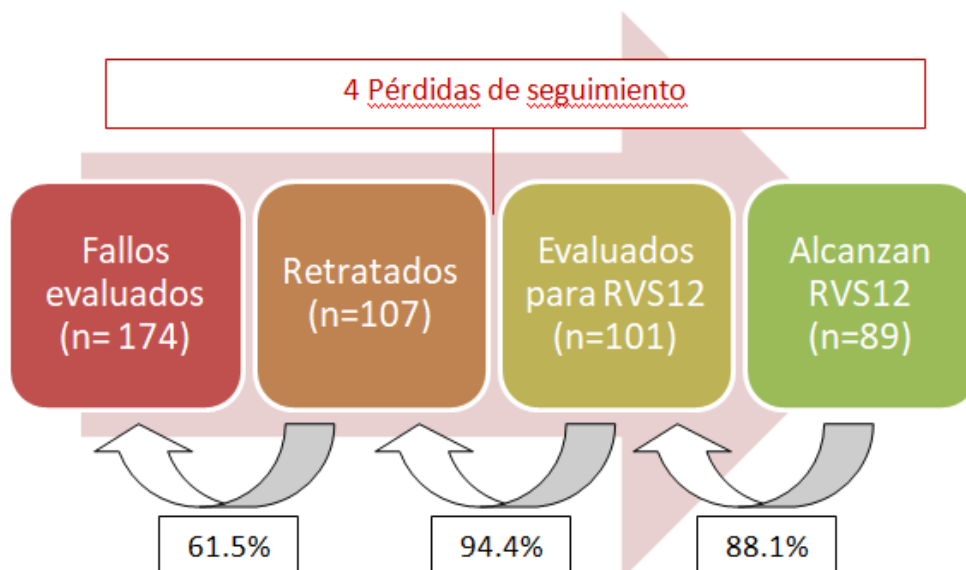


Figura 19: Seguimiento virológico de los pacientes que fallan a SOF/LDV±RBV

En total, doce pacientes no consiguen de nuevo RVS12 tras el retratamiento con la información de las SARs. De estos doce enfermos, la mitad estaban infectados con el genotipo 1a del VHC, teniendo todos ellos uno o más factores pronósticos para una menor respuesta a los regímenes de AADs convencionales como es, por ejemplo, la coinfección con VIH. Dos pacientes no tuvieron mutaciones en NS5A, NS3 o NS5B en el fallo, siendo ambos coinfectados con VIH; uno de ellos falló un régimen de sofosbuvir/simeprevir/ribavirina con una duración subóptima de 12 semanas, mientras que el otro no logró alcanzar la RVS12 en un régimen de 24 semanas de sofosbuvir/ledipasvir sin ribavirina. Los otros cuatro pacientes eran cirróticos, tenían SARs en NS5A y se les volvió a tratar con regímenes inadecuados ya fueren, basados en ledipasvir (estaban infectados por virus con la mutación Q30R ó L31F, respectivamente, en NS5A), en grazoprevir/ elbasvir también con resistencia inadecuada (M28T+Q30R), ó con un régimen subóptimo basado en simeprevir. Cabe destacar que para el paciente con la RAS L31F, ledipasvir se informó como susceptible en nuestro informe inicial, según la información disponible en ese momento en el consenso de Lontok⁵⁶. L31F fue señalado por Sorbo et al. en la actualización del 2018 como SARs a ledipasvir, con un impacto incierto en la actividad de este fármaco⁷³. En la siguiente tabla mostrada en la siguiente página, se detallan las características de los pacientes infectados por genotipo 1a, que fallaron a una primera línea con sofosbuvir/ledipasvir (tabla 22).

Genotipo 1a (n=38):

SARs NS5A (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS3 (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS5B (n) [datos <i>in vitro</i>]	Régimen de retratamiento (n)	Adecuado a resistencias	RVS12
Wt (13)	Wt (11)	Wt (13)	SOF/SMV 12s (1)	Sí	Sí
			SOF/SMV/RBV 12s (1)	Sí	No¹
			SOF/SMV/RBV 24s (2)	Sí	Sí
			SOF/LDV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
			SOF/LDV 24s (1)	Sí	No²
			SOF/LDV/RBV 24s (3)	Sí	Sí
			SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
			MK3682/RBV 24s (1)	Sí	Sí
	S122G (1)		PrOD/RBV 12s (1)	Sí	Sí
	D168A (1) [HLR a PTV, GRZ ILR a SMV]		PrOD/RBV 24s (1)	No	Sí
M28ATV+Q30R (3) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV-28AT, VEL-28A-; ILR a VEL-28T-]	Wt (3)	Wt(3)	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
			GRZ/EBV 12s (1)	No	No³
			SOF/GRZ/EBV 24s (1)	Sí [#]	Sí
Q30HR (12) [HLR a DCV, LDV, OMB-30R-, EBV- 30R-; ILR a EBV-30H-]	Wt (9)	Wt (12)	SOF/LDV/RBV 12s (1)	No	Sí
			SOF/LDV/RBV 24s (2)	No	Sí
			SOF/SMV/RBV 24s (4)	No	No⁴
			SOF/PrOD/RBV 24s (1)	Sí	No (1)⁵
			SOF/GRZ/EBV/RBV 24s (1)	Sí (3)	Sí (3)
	V55I (1)		GRZ/EBV 16s (1)	Sí [#]	Sí
	S122G (1)		SOF/GRZ/EBV/RBV 24s (1)	Sí [#]	Sí
	R155T (1) [HLR a GRZ; ILR a SMV]		SOF/SMV/RBV 24s (1)	No	Sí
L31IM (9) [HLR a DCV-31M-, LDV, EBV-31M-, VEL-31M-; ILR a DCV & VEL- 31I-]	Wt (9)	Wt (9)	SOF/SMV 24s (1)	Sí	Sí
			SOF/SMV/RBV 24s (3)	Sí	Sí
			PrOD/RBV 24s (1)	Sí	Sí
			SOF/GRZ/EBV/RBV 16s (1)	Sí [#]	Sí
			SOF/GRZ/EBV 24s (1)	Sí [#]	Sí
			SOF/GRZ/EBV/RBV 24s (2)	Sí [#]	Sí
L31F (1) [HLR a EBV, VEL; ILR a DCV]	Wt (1)	Wt(1)	SOF/LDV/RBV 24s (1)	Sí	No⁴

Tabla 22: Descripción detallada de las SARs detectadas en el fallo con ledipasvir, su impacto *in vitro* en la actividad de los AADs, el régimen utilizado para el nuevo tratamiento, su adecuación al informe guiado por resistencia y la eficacia del nuevo tratamiento, en pacientes con VHC-1a.

Wt: tipo salvaje, sin SARs. ¹coinfectado VIH; ²coinfectado VIH y expuesto previamente a IFN; ³cirróticos y expuestos a IFN; ⁴cirróticos, coinfectados VIH y expuestos a IFN; ⁵cirrosis y RBV suspendida prematuramente debido a efectos adversos en el régimen AADs de primera línea. HLR: resistencia de alto nivel; ILR: resistencia de nivel intermedio. Para AADs de primera generación (LDV, DCV, OMB, SMV, PTV, DSV): HLR, SARs con *fold-change(FC)* > 100X; ILR, SARs con *fold-change(FC)* de 20–100. Para AADs de segunda generación (EBV, VEL, GRZ): HLR, SARs con *fold-change* > 10X; ILR, RAS con *fold-change* de 2.6–9X. SOF: sofosbuvir; SMV: simeprevir; PTV: paritaprevir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; OMB: ombitasvir; DSV: dasabuvir; PrO: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir; PrOD: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir / dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; VEL: velpatasvir; s: semanas; #Régimen farmacológico con tres o cuatro componentes: resistencia sólo a uno de los componentes del régimen y/o ninguna otra opción en el momento del nuevo tratamiento.

Dentro de los 32 pacientes infectados con el genotipo 1b que fallaron primeramente a un régimen basado en sofosbuvir/ledipasvir, hubieron dos que tampoco lograron alcanzar RVS12 con una pauta de retratamiento basada en simeprevir. Ambos pacientes eran cirróticos, coinfectados con VIH y estuvieron expuestos previamente a terapias con IFN. Los datos detallados de los pacientes con genotipo 1b se observan en la tabla 23.

Genotipo 1b (n=32):

SARs NS5A (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS3 (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS5B (n) [datos <i>in vitro</i>]	Régimen de retratamiento (n)	Adecuado a resistencias	RVS12	
Wt (2)	Wt (2)	Wt (2)	SOF/SMV/RBV 24s (1) PrOD/RBV 24s (1)	Sí Sí	No¹ Sí	
L28M+Y93H (1) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV; ILR a VEL]	Wt (1)	Wt (1)	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí	
R30Q+Y93H (1) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV; ILR a VEL]	Wt (1)	Wt (1)	SOF/SMV 12s (1)	Sí	Sí	
L31M (3)	Wt (3)	Wt (1)	PrOD/RBV 12s (1)	Sí	Sí	
		C316N (2) [DSV SARs <i>in vitro</i>]	SOF/SMV 12s (1) SOF/SMV±RBV 12s (1)	Sí Sí	Sí Sí	
L31IMV+Y93H (13) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV, VEL]	Wt (11)	Wt (4)	SOF/SMV 24s (1) SOF/SMV/RBV 24s (2) SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí Sí Sí [#]	Sí Sí Sí	
			C316N (9) [DSV SARs <i>in vitro</i>]	SOF/SMV/RBV 24s (5) SOF/PrOD 24s (1) SOF/PrOD/RBV 24s (1)	Sí Sí [#] Sí [#]	Sí Sí Sí
				S122T (2)	SOF/SMV 12s (1) SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí Sí
	Wt (12)	Wt (3)	SOF/SMV/RBV 24s (3)		Sí	Sí
Y93H (12) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV ILR a VEL]	Wt (12)	C316N (9) [DSV SARs <i>in vitro</i>]	SOF/SMV 24s (2)	Sí Sí	No¹ Sí	
			SOF/SMV/RBV 24s (5) SOF/PrOD/RBV 24s (1) SOF/GRZ/EBV 24s (1)	Sí Sí [#] Sí [#]	Sí Sí Sí	
				Sí	Sí	

Tabla 23: Descripción detallada de las SARs detectadas en el fallo con ledipasvir, su impacto *in vitro* en la actividad de los AADs, el régimen utilizado para el nuevo tratamiento, su adecuación al informe guiado por resistencia y la eficacia del nuevo tratamiento, en pacientes con VHC-1b.

Wt: tipo salvaje, sin SARs. ¹cirrótico y expuesto a INF. HLR: resistencia de alto nivel; ILR: resistencia de nivel intermedio. Para AADs de primera generación (LDV, DCV, OMB, SMV, PTV, DSV): HLR, SARs con FC >100X; ILR, SARs con FC de 20–100. Para AADs de segunda generación (EBV, VEL, GRZ): HLR, SARs con FC >10X; ILR, RAS con FC de 2.6–9X. SOF: sofosbuvir; SMV: simeprevir; PTV: paritaprevir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; OMB: ombitasvir; DSV: dasabuvir; PrO:

paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir; PrOD: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir / dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; VEL: velpatasvir; s: semanas; #Régimen farmacológico con tres o cuatro componentes: resistencia sólo a uno de los componentes del régimen y/o ninguna otra opción en el momento del nuevo tratamiento.

Dentro de los pacientes que fallaron con sofosbuvir/ledipasvir hubieron diez pacientes con GT-3 y veintiuno con GT-4. Uno de los pacientes con GT-3 y tres pacientes de los pacientes con GT-4 tampoco lograron RVS12 con el régimen de retratamiento. Hubieron tres pacientes que no mostraron SARs en ninguna de las tres dianas (NS5A, NS3 o NS5B), y sólo uno de ellos, cirrótico, siguió una pauta subóptima con simeprevir durante 12 semanas. El cuarto paciente que no consiguió RVS12, siguió una pauta basada en ledipasvir no adecuada al informe guiado por resistencias. Los detalles de estos pacientes se muestran en la tabla 24 de la página siguiente. Las siguientes notas, hacen referencia a esta misma tabla 24.

Wt: tipo salvaje, sin SARs, RVS12: respuesta viral sostenida en la semana 12 post-tratamiento. ¹cirrótico; ²cirrótico y expuesto a INF; ³coinfectado con VIH y expuesto a INF; ⁴coinfectado con VIH, cirrótico y expuesto a INF. HLR: resistencia de alto nivel; ILR: resistencia de nivel intermedio. Para AADs de primera generación (LDV, DCV, OMB, SMV, PTV, DSV): HLR, SARs con FC >100X; ILR, SARs con FC de 20–100. Para AADs de segunda generación (EBV, VEL, GRZ): HLR, SARs con FC >10X; ILR, RAS con FC de 2.6–9X. SOF: sofosbuvir; SMV: simeprevir; PTV: paritaprevir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; OMB: ombitasvir; DSV: dasabuvir; PrO: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir; PrOD: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir / dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; VEL: velpatasvir; s: semanas; #Régimen farmacológico con tres o cuatro componentes: resistencia sólo a uno de los componentes del régimen y/o ninguna otra opción en el momento del nuevo tratamiento.

Genotipo 3 (n=10) y genotipo 4 (n=21):

GT (n)	SARs NS5A (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS3 (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS5B (n) [datos <i>in vitro</i>]	Régimen de retratamiento (n)	Adecuado a resistencias	RVS12
3 (10)	Wt (10)		Wt (10)	SOF/DCV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
				SOF/DCV 24s (1)	Sí	Sí
				SOF/DCV/RBV 24s (5)	Sí	No (1)¹
				SOF/LDV/RBV 24s (1)	Sí (4)	Sí (4)
				SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (2)	Sí	Sí
4 (21)	Wt (10)	Wt (10)	Wt (10)	SOF/SMV 12s (1)	Sí	No²
				SOF/SMV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
				SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
				SOF/LDV 12s (1)	Sí	Sí
				PrO/RBV 12s (2)	Sí	No³
				Sí	Sí	
				SOF/DCV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
				GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
				SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
				SOF/GRZ/EBV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
L28MV (4) [HLR a OMB en Gt-4d; ILR a LDV, OMB en Gt-4a]	Wt (3)		Wt (2)	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
				SOF/PrO/RBV 24s (1)	Sí [#]	Sí
			S282T (1) [SOF SARs <i>in vitro</i>]	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
		D168E (1)	Wt (1)	SOF/GRZ/EBV 12s (1)	Sí	Sí
L30H (1) [HLR a DCV en Gt-4a]	Wt (1)		Wt (1)	SOF/LDV/RBV 24s (1)	Sí	No⁴
Y93C (4) [<i>In vitro</i> SARs a DCV, LDV, OMB, EBV, VEL]	Wt (4)		Wt (4)	SOF/SMV/RBV 24s (3)	Sí	Sí
				SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
Y93H (2) [HLR a DCV, LDV ILR a EBV, VEL en Gt-4a]	Wt (2)		Wt (1)	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
				S282T (1) [SOF SARs <i>in vitro</i>]	SOF/VEL/RBV 24 s (1)	Sí

Tabla 24: Descripción detallada de las SARs detectadas en el fallo con ledipasvir, su impacto *in vitro* en la actividad de los AADs, el régimen utilizado para el nuevo tratamiento, su adecuación al informe guiado por resistencia y la eficacia del nuevo tratamiento, en pacientes con VHC-3 y VHC-4.

Fallos a regímenes basados en sofosbuvir-daclatasvir

Un total de 77 pacientes estudiados (23,9%) fracasaron a sofosbuvir/daclatasvir ± ribavirina, y casi dos tercios de estos enfermos estaban infectados con el genotipo 3. Nuevamente, el genotipo 3 era el menos propenso a desarrollar SARs en NS5A (70,6%); en contraste, todos los pacientes infectados con el genotipo 1b desarrollaron SARs. Para los genotipos 1a y 1b, las SARs en NS3 se detectaron en el fracaso en el 25,0% y el 11,1% de los pacientes, respectivamente. Estos hallazgos se resumen en la Tabla 25.

Genotipo (%)	% SARs (totales)	% SARs
1a (20,8%)	87,5%	62,5% NS5A 25,0% NS5A+NS3
1b (11,7%)	100,0%	88,9% NS5A 11,1% NS5A+NS3
3a (66,2%)	70,6%	70,6% NS5A (Y93H)
4 (1,3%)	100,0%	100,0% NS5A

Tabla 25: Prevalencia de SARs detectadas por región en los pacientes que han fallado a un régimen basado en sofosbuvir/daclatasvir

Hasta el final del periodo de seguimiento, únicamente 44 pacientes (57,1%) fueron tratados de nuevo con regímenes convencionales, siendo el 71% cirróticos. De estos 44 enfermos, tres pacientes suspendieron el tratamiento prematuramente debido a efectos secundarios y dos fallecieron mientras estaban en tratamiento; además, un paciente se perdió durante el seguimiento, por lo que, fueron 36 los que fueron evaluados para RVS12. El aclaramiento viral se alcanzó en 30 pacientes así que, en un enfoque modificado de intención de tratar, la eficacia del retratamiento guiado por resistencias de los fallos a sofosbuvir/daclatasvir ± ribavirina con regímenes convencionales fue del 83,3%. Una descripción detallada de estos hallazgos se muestra en la Figura 20.

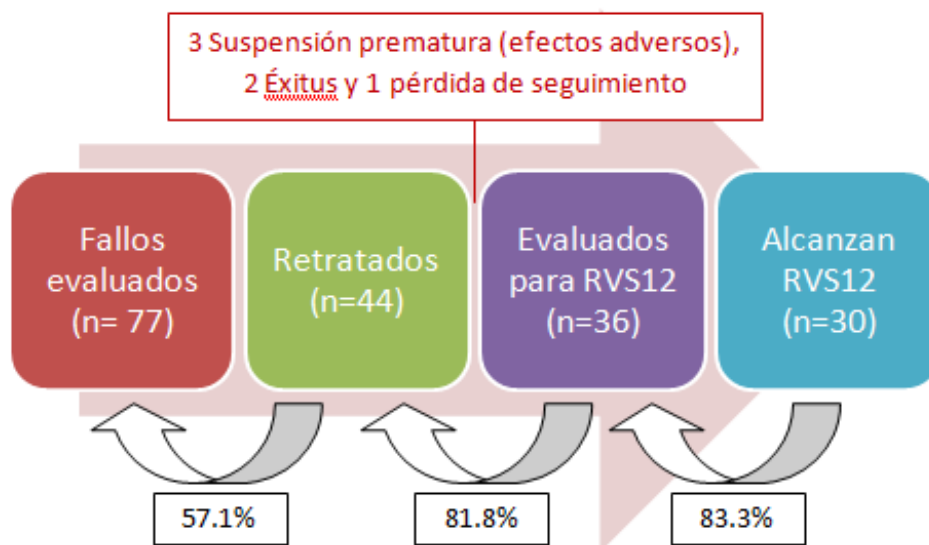


Figura 20: Seguimiento virológico de los pacientes que fallan a SOF/DCV±RBV

Después de fracasar en un régimen basado en daclatasvir, seis pacientes no alcanzaron la RVS12 después del retratamiento guiado por resistencia. De estos seis pacientes, dos pacientes fueron infectados con el genotipo 1a. El primer paciente fue cirrótico, coinfectado con VIH y expuesto a IFN. Este primer paciente tenía un patrón de SARs complejo en NS5A (M28T + Q30H) y fue retratado con sofosbuvir / simeprevir / ribavirin durante 24 semanas. Según Hezode et al.⁷⁴, los regímenes que contienen simeprevir, incluso con ribavirina y con una duración de 24 semanas, pueden ser subóptimos en pacientes con varios factores que disminuyen la tasa de RVS. El segundo paciente infectado con el genotipo 1a fue un paciente cirrótico que albergaba L31V en NS5A y se volvió a tratar con sofosbuvir / ledipasvir / ribavirina durante 24 semanas. Ledipasvir fue informado como susceptible por nuestro informe inicial basado en la información disponible en el consenso de Lontok et al.⁵⁶ con respecto a las RASs de los fármacos. Sin embargo, se informa que la sustitución de L31V tiene una resistencia de alto nivel a ledipasvir (> 100 Fold-Change [FC]) en la actualización adicional en 2018

realizada por Sorbo et al⁷³. De los pacientes infectados por genotipo 1b, uno falló y se retrató con sofosbuvir / ledipasvir durante 12 semanas. A pesar de detectarse en el momento del fallo la combinación de SARs L31IMV + Y93H, la pauta de retratamiento escogida era inadecuada al contener la cepa SARs de alto nivel descritas a ledipasvir. Los pacientes restantes que no alcanzaron RVS12 después del retratamiento guiado por resistencias estaban infectados con el genotipo 3 y todos presentaron la sustitución de Y93H en NS5A. Uno de ellos era cirrótico, coinfectado por VIH y expuesto a IFN y se volvió a tratar con un régimen de sofosbuvir y ribavirina durante 24 semanas, considerándose ésta una combinación subóptima. Los otros dos pacientes fueron tratados con sofosbuvir / velpatasvir / ribavirina durante 12 o 24 semanas y eran cirróticos y habían estado expuestos anteriormente a IFN. La SAR Y93H es altamente desafiante para el retratamiento de los pacientes al conferir resistencia de alto nivel a todos los inhibidores de NS5A aprobados activos contra el genotipo 3, incluido velpatasvir (FC = 720). Hasta la fecha, pibrentasvir es el único inhibidor de NS5A que está libre del efecto de resistencia de Y93H en genotipo 3⁷³, no estando todavía disponible en nuestro país en el momento del estudio.

A continuación, se muestra una descripción detallada de las SARs detectadas en el fallo, su impacto *in vitro* en la actividad de los AADs, el régimen utilizado para el retratamiento, su adecuación al informe guiado por resistencias y la eficacia de la segunda línea de tratamiento (tabla 26).

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

GT (n)	SARs NS5A (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS3 (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS5B (n) [datos <i>in vitro</i>]	Régimen de retratamiento (n)	Adecuado a resistencias	RVS 12
1a (9)	Wt (1)	Wt (1)	Wt (1)	SOF/SMV 24s (1)	Sí	Sí
	M28T+Q30HR (2) [HLR a LDV, DCV, OMB, EBV; ILR a VEL-M28T-]	Wt (2)	Wt (2)	SOF/SMV/RBV 24s (2)	Sí Sí	Sí No ¹
	Q30DHKR (4) [HLR a DCV, LDV-30HKR, OMB-30KR-, EBV-30DR-, VEL-30K-; ILR a EBV-30H-]	Wt (4)	Wt (4)	SOF/SMV 24s (1) SOF/SMV/RBV 24s (2) PrOD/RBV 24s (1)	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí
	Q30R+L31M (1) [HLR a LDV, DCV, OMB, EBV, VEL]	V36M+R155K (1) [HLR a GRZ; ILR a SMV, PTV]	Wt (1)	PrOD/RBV 24s (1)	No	Sí
	L31V (1) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV, VEL]	Wt (1)	Wt (1)	SOF/LDV/RBV 24s (1)	No	No ²
1b (5)	L31M (1)	Wt (1)	Wt (1)	PrOD/RBV 24s (1)	Sí	Sí
	L31IMV+Y93H (2) [HLR a LDV, DCV, OMB, EBV; ILR a VEL]	Wt (2)	C316N (2) [DSV RAS <i>in vitro</i>]	SOF/LDV 12s (1) SOF/PrOD/RBV 24s (1)	No Sí [#]	No ³ Sí
	L31M+Y93H (1) [HLR a LDV, DCV, OMB, EBV, VEL]	Q80R+D168E (1) [HLR a SMV; ILR a GRZ]	Wt (1)	PrOD 12s (1)	No	Sí
	A92K (1) [HLR a LDV, VEL]	Wt (1)	Wt (1)	SOF/LDV/RBV 12s (1)	No	Sí
3 (21))	Wt (2)		Wt (2)	SOF/VEL 12s (1) SOF/VEL/RBV 24s (1)	Sí Sí	Sí Sí
	A30K (2) [HLR a VEL; ILR a DCV]		Wt (2)	SOF/LDV 24s (1) SOF/VEL 12s (1)	Sí No	Sí Sí
	L31F (1) [HLR a DCV; ILR a VEL]		Wt (1)	SOF/LDV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
	Y93H (16) [HLR a DCV, VEL]		Wt (16)	SOF/RBV 24s (2) SOF/PegINT/RBV 12s (2) SOF/DCV/RBV 24s (4) SOF/VEL/RBV 12s (3) SOF/VEL 24s (1) SOF/VEL/RBV 24s (2) SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1) SOF/GRZ/EBV/RBV 16s (1)	Sí Sí Sí No No No (2) No No No Sí [#] Sí [#]	No ¹ Sí Sí Sí No Sí (2) Sí Sí No ⁴ Sí
4 (1)	Y93H (1) [HLR a DCV, LDV; ILR a EBV, VEL*] (*: only GT4a)	Wt (1)	Wt (1)	PrO/RBV 24s (1)	Sí	Sí

Wt: tipo salvaje, sin SARs; RVS12: respuesta viral sostenida en la semana 12 post-tratamiento. ¹ Estos pacientes eran cirróticos, coinfectados por VIH y con antecedentes de exposición a INF; ² cirrosis; ³ expuesto a IFN; ⁴ este paciente era cirrótico y estuvo expuesto a INF en el pasado. HLR: resistencia de alto nivel; ILR: resistencia de nivel intermedio. Para AADs de primera generación (LDV, DCV, OMB, SMV, PTV, DSV): HLR, SARs con FC >100X; ILR, SARs con FC de 20–100. Para AADs de segunda generación (EBV, VEL, GRZ): HLR, SARs con FC >10X; ILR, RAS con FC de 2.6–9X. SOF: sofosbuvir; SMV: simeprevir; PTV: paritaprevir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; OMB: ombitasvir; DSV: dasabuvir; PrO: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir; PrOD: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir / dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; VEL: velpatasvir; s: semanas; #Régimen farmacológico con tres o cuatro componentes: resistencia sólo a uno de los componentes del régimen y/o ninguna otra opción en el momento del nuevo tratamiento.

Fallos en regímenes que contienen ombitasvir

Se han evaluado 62 pacientes (19,1%) que fallaron una combinación de paritaprevir_{ritonavir} / ombitasvir ± dasabuvir ± ribavirina. La gran mayoría de estos pacientes estaban infectados con el genotipo 1a (59,7%) ó 1b (25,8%) y, únicamente, el 12,9% de los pacientes estaban infectados con el genotipo 4. Un total de 1,6% de los pacientes fueron tratados erróneamente con estas combinaciones porque fueron considerados con genotipo erróneo en su centro de origen. Los genotipos 3 y 1a desarrollaron SARs en el fallo en una gran proporción de pacientes (100,0% y 86,5%, respectivamente). El desarrollo de SARs en más de un gen fue común en todos los genotipos. La tabla 27 resume estos hallazgos.

Genotipo (%)	% SARs (totales)	% SARs
1a (59,7%)	86,5%	2,7% NS3 35,1% NS5A 2,7% NS5B 2,7% NS5B+NS3 10,8% NS5B+NS5A 13,5% NS5A+NS3 18,9% NS5B+NS5A+NS3
1b (25,8%)	75,0%	6,2% NS5B 31,2% NS5A 12,6% NS3 12,6% NS5B+NS5A 6,2% NS5B+NS3 6,2% NS5A+NS3
3a (1,6%)	100,0%	100,0% NS5A (Y93H)
4 (12,9%)	50,0%	50,0% NS5A

Tabla 27: Prevalencia de SARs detectadas por región en los pacientes que han fallado a un régimen que contenía ombitasvir

La Figura 21 muestra la eficacia del retratamiento con resistencia guiada en pacientes que fallaron a un régimen de paritaprevir_{ritonavir} / ombitasvir ± dasabuvir ± ribavirina. Treinta y cinco pacientes (56,5%) fueron tratados nuevamente con regímenes convencionales, siendo el 26,7%, cirróticos. En el seguimiento serológico se observó que un paciente falleció durante el tratamiento y otros treinta y dos pacientes fueron evaluados para RVS12; treinta de ellos han eliminado la infección por VHC. En un enfoque modificado de intención de tratar, la eficacia del retratamiento con regímenes convencionales y con informe guiado por resistencias, para los pacientes que fallaron a paritaprevir_{ritonavir} / ombitasvir ± dasabuvir ± ribavirina fue del 93,7%.

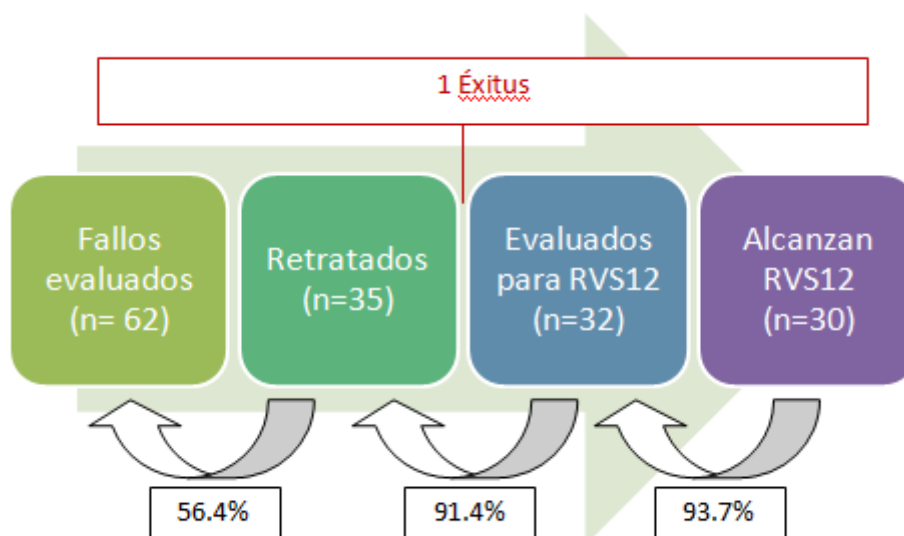


Figura 21: Seguimiento virológico de los pacientes que fallan a un tratamiento con ombitasvir

Los dos pacientes que habían fallado previamente un régimen basado en PrO y no alcanzaron la RVS después del retratamiento guiado por resistencia, fueron infectados con el genotipo 4. Un paciente fue tratado nuevamente con un régimen subóptimo basado en ledipasvir en presencia de la SAR Y93H. El segundo paciente, con una variante Y93C, fue tratado con una potente combinación triple (sofosbuvir / grazoprevir / elbasvir) con ribavirina, pero sólo durante 12 semanas. Aunque Y93C tiene un alto impacto en la actividad de elbasvir en el genotipo 1a, su impacto en el genotipo 3 aún no se ha descrito.

La siguiente tabla 28 muestra una descripción detallada de los SARs detectadas en el fallo a primera línea, su impacto *in vitro* en la actividad de los ADDs, el régimen utilizado para el nuevo tratamiento, su adecuación a la información de resistencia facilitada y la eficacia del retratamiento.

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

GT (n)	SARs NS5A (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS3 (n) [datos <i>in vitro</i>]	SARs NS5B (n) [datos <i>in vitro</i>]	Régimen de retratamiento (n)	Adecuación a resistencias	RVS 12
1a (19)	Wt (6)	Wt (6)	Wt (5)	SOF/LDV/RBV 12s (2) SOF/LDV/RBV 24s (2) SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí
			S556G (1) [SARs DSV <i>in vitro</i>]	SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
	M28T (3) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV ILR a VEL]	Wt (2)	Wt (2)	SOF/SMV/RBV 24s (1) SOF/PrOD/RBV 12s (1)	Sí Sí [#]	Sí Sí
		R155K (1) [ILR a SMV, PTV, GRZ]	S556G (1) [SARs DSV <i>in vitro</i>]	SOF/GRZ/EBV/RBV 24s (1)	Sí [#]	Sí
	M28TV+Q30R (2) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV ILR a VEL ⁺] (⁺ only M28T)	V36M+R155K (1) [HLR a GRZ ILR a SMV, PTV]	Wt (2)	SOF/GRZ/EBV/RBV 16s (1)	Sí [#]	Sí
		Wt (1)		SOF/SMV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
	Q30HR (4) HLR a DCV, LDV, OMB ⁺ , EBV ⁺ (⁺ only Q30R) ILR a EBV (Q30H)	Wt (4)	Wt (4)	SOF/SMV/RBV 24s (1) SOF/PrOD/RBV 12s (1) SOF/VEL 12s (1) SOF/VEL/RBV 24s (1)	Sí Sí Sí Sí	Sí Sí Sí Sí
	Q30K (1) [HLR a DCV, LDV, OMB, VEL]	Wt (1)	C316Y (1) [HLR a DSV]	SOF/LDV/RBV 12s (1)	No	Sí
	Q30R (2) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV]	S122G (1)	C316Y (2) [HLR a DSV]	SOF/PrOD 24s (1)	Sí [#]	Sí
		D168V (1) [HLR a SMV, PTV, GRZ]		SOF/GRZ/EBV/RBV 16s (1)	Sí [#]	Sí
Q30R+H58D (1) HLR a DCV, LDV, OMB, EBV ILR a VEL (only H58D)	Wt (1)	Wt (1)	SOF/SMV 24s (1)	Sí	Sí	
1b (6)	Wt (1)	Wt (1)	C316N+S556G [SARs DSV <i>in vitro</i>]	SOF/SMV 24s (1)	Sí	Sí
	Wt (1)	S122T (1)	Wt (1)	SOF/GRZ/EBV/RBV 16s (1)	Sí	Sí
	Y93H (4) [HLR a DCV, LDV, OMB, EBV ILR a VEL]	Wt (3)	Wt (1)	SOF/SMV/LDV 24s (1)	Sí [#]	Sí
		D168V (1) [HLR a SMV, PTV, GRZ]	C316N (3) [SARs DSV <i>in vitro</i>]	SOF/SMV 12s (1) GRZ/EBV 12s (1)	Sí No	Sí Sí
SOF/GRZ/EBV 12s (1)	Sí [#]			Sí		
3*	Y93H (1) [HLR a DCV, VEL]		Wt (1)	SOF/DCV/RBV 24s (1)	No	Sí

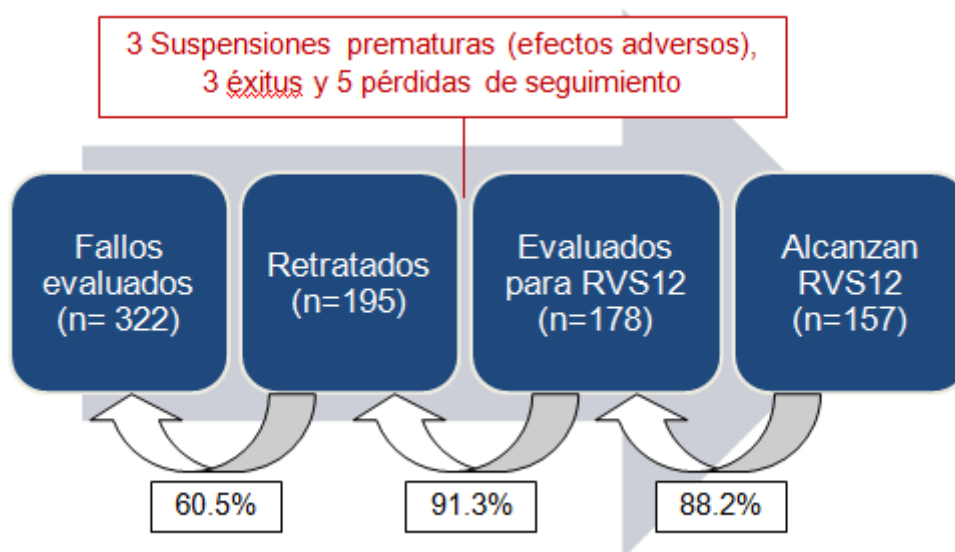
Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

4 (6)	Wt (1)	Wt (1)	Wt (1)	SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
	L28VS (2) HLR a OMB for GT4d ILR a OMB for GT4a	Wt (1)	Wt (2)	SOF/LDV/RBV 24s (1)	Sí	Sí
		D168A (1) [HLR a GRZ]		SOF/SMV/RBV 12s (1)	Sí	Sí
Y93CHS (3) [HLR a DCV, LDV ILR a DCV, EBV, VEL]	Wt (3)	Wt (3)	SOF/SMV 24s (1) SOF/LDV 12s (1) SOF/GRZ/EBV/RBV 12s (1)	Sí No Sí [#]	Sí No ¹ No	

Wt: tipo salvaje, sin SARs; RVS12: respuesta viral sostenida en la semana 12 post-tratamiento. *Este paciente fue genotipado fue tratado erróneamente con PrOD, por error de transcripción del genotipo en el centro de origen. ¹Paciente coinfectado con VIH. HLR: resistencia de alto nivel; ILR: resistencia de nivel intermedio. Para AADs de primera generación (LDV, DCV, OMB, SMV, PTV, DSV): HLR, SARs con FC >100X; ILR, SARs con FC de 20–100. Para AADs de segunda generación (EBV, VEL, GRZ): HLR, SARs con FC >10X; ILR, RAS con FC de 2.6–9X. SOF: sofosbuvir; SMV: simeprevir; PTV: paritaprevir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; DCV: daclatasvir; OMB: ombitasvir; DSV: dasabuvir; PrO: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir; PrOD: paritaprevir_(ritonavir) / ombitasvir / dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; VEL: velpatasvir; s: semanas; [#]Régimen farmacológico con tres o cuatro componentes: resistencia sólo a uno de los componentes del régimen y/o ninguna otra opción en el momento del nuevo tratamiento.

Tabla 28: Descripción detallada de las SARs detectadas en el fallo con PrO±D, su impacto *in vitro* en la actividad de los AADs, el régimen utilizado para el nuevo tratamiento, su adecuación al informe guiado por resistencia y la eficacia del retratamiento.

➤ *Resumen gráfico de los resultados del retratamiento de los pacientes:*



Durante el periodo de experimental y de análisis de este trabajo, he presentado varias comunicaciones relacionadas con los resultados en congresos regionales, nacionales e internacionales. He obtenido 3 premios en tres de estos congresos por estas comunicaciones, uno regional y dos nacionales. Los diplomas de estos premios se adjuntan en los anexos IV, V, y VI, respectivamente.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SARs BASALES

Un total de 516 pacientes infectados por el VHC fueron incluidos en el estudio. Los pacientes eran principalmente varones (78,0%), con una mediana de edad de 52 años (RIC 48-56), una carga viral de VHC basal media de 6,31 log UI/ml (RIC 5,77-6,74), 31,1% cirróticos y 24,6% con experiencia previa con interferón. La mayoría de los pacientes estaban infectados con VHC GT-1a (n=223; 43,2%), seguidos por 141 pacientes con infección por VHC GT-3 (27,3%), 82 con infección por VHC GT-1b (15,9%) y 70 con infección por VHC GT-4 (13,6%). Las principales características de la población de estudio se muestran en la tabla 1. Este genotipado inicial, previo a comenzar la terapia, realizado como parte de la atención clínica de rutina a través de la prueba disponible comercialmente en el centro participante, fue en la mayoría de los casos, realizado con el ensayo Versant HCV Genotype 2.0 LiPA, seguido del ensayo Abbott Real Time HCV Genotype II y del kit de genotipado Trugene HCV Genotyping.

CARACTERÍSTICAS BASALES	n _(total) = 516
Edad en años, media (RIC)	52 (IQR 48-56)
Varones, %	78,0%
Cirróticos, %	31,1%
Pretratados con INF, %	24,6%
RNA, log UI/ml (RIC)	6,31 (5,77-6,74)
Genotipo de VHC:	
1a, n (%)	223 (43,2%)
1b, n (%)	82 (15,9%)
3, n (%)	141 (27,3%)
4, n (%)	70 (13,6%)

Tabla 29: Características basales de los pacientes estudiados

A continuación, en la tabla 30 se muestra una descripción detallada de las SARs en NS5A detectadas para los genotipos de VHC 1a, 1b, 3 y 4, y también de las SARs en detectadas en NS3 para GT-1a.

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

	Posición	GT-1a (n; %)	GT-1b (n; %)	GT-3 (n; %)	GT-4 (n; %)
NS5A	24	-	-	-	-
	28	11; 4,9%	-	-	2; 2,8%
	30	8; 3,6%	1; 1,2%	9; 6,4% 9; 6,4%* (A30MSV)	1; 1,4%
	31	3; 1,3%	12; 14,6%	-	3; 4,3%* (M31LV)
	32	1; 0,4%* (P32H)	-	-	-
	38	-	-	-	-
	58	1; 0,4% 14; 6,3%* (H58GPY)	3; 3,6% 3; 3,6%* (P58AT)	-	1; 1,4%* (P58L)
	62	-	-	-	-
	92	-	2; 2,4%* (A92T)	-	-
	93	1; 0,4%* (Y93L)	6; 7,3%	9; 6,4%	-
	NS3	36	1; 0,4% 3; 1,3%* (V36L)		
54		-			
55		1; 0,4%* (V55A)			
56		-			
80		6; 2,7% 2; 0,9%* (Q80L)			
122		5; 2,2% 3; 1,3%* (S122N)			
168		2; 0,9%			
170		-			

Tabla 30: Prevalencia de SARs detectadas en NS5A y NS3 por genotipo
*(azul): estos cambios no se encuentran listados en el utilizado consenso de Lontok⁵⁶.

En esta tabla 30 podemos observar que, en total, 70 pacientes (13,6%) mostraron SARs en NS5A y/o en NS3 (n=56; 10,8%, para NS5A y n=14; 6,3%; para NS3). En GT-1a, 36 pacientes (16,2%) mostraron SARs en NS5A y/o NS3 (n=22; 9,9%, para NS5A y n=14; 6,3%, para NS3). Veintidós pacientes (26,8%) de los infectados con VHC GT-1b, nueve (6,4%) de los pacientes infectados con GT-3 y tres (4,3%) pacientes infectados con GT-4 albergaban SARs en NS5A.

Como hemos descrito en el apartado de la metodología, hemos realizado un seguimiento virológico de estos pacientes para estudiar, además de la presencia de SARs, si iniciaban tratamiento con AADs, con qué régimen y la eficacia alcanzada. Del total de pacientes a los que se les ha realizado el estudio de SARs, hasta el momento del análisis, trescientos dos pacientes iniciaron tratamiento con AADs. Seguidamente, se muestra una descripción detallada según el genotipo, de los regímenes de AADs iniciados, teniendo en cuenta la presencia o no de cirrosis y la exposición previa a INF, en la tabla 31.

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

Genotipo VHC	Régimen AADs (n)	Cirrosis (n/N; %)	TPI (n/N; %)	Cirrosis y TPI (n/N; %)
1 ^a	SOF-LDV±RBV (79)	16/78; 20,5%	21/74; 28,4%	7/73; 9,6%
	SOF-SMV-RBV (1)	-	1/1; 100,0%	-
	PrOD±RBV (20)	1/19; 5,3%	4/15; 26,7%	-
	GRZ-EBV±RBV (13)	2/13; 15,4%	2/11; 18,2%	-
	SOF-VEL (1)	1/1; 100,0%	-	-
1b	SOF-LDV±RBV (35)	6/35; 17,1%	4/35; 11,4%	3/35; 8,6%
	SOF-SMV±RBV (2)	-	-	-
	PrOD±RBV (33)	10/32; 31,2%	10/33; 30,3%	1/32; 3,1%
	GRZ-EBV (1)	1/1; 100,0%	-	-
3	SOF-PegINT-RBV (2)	-	-	-
	SOF-DCV±RBV (45)	8/44; 18,2%	6/44; 13,6%	4/43; 9,3%
	SOF-LDV-RBV (2)	1/2; 50,0%	-	1/2; 50,0%
	SOF-VEL±RBV (14)	8/14; 57,1%	-	3/14; 21,4%
4	SOF-LDV±RBV (25)	7/25; 28,0%	4/25; 16,0%	1/25; 4,0%
	SOF-DCV (1)	-	-	-
	SOF-SMV (2)	-	-	-
	PrO±RBV (22)	5/21; 23,8%	2/22; 9,1%	1/21; 4,7%
	GRZ-EBV (3)	-	1/3; 33,3%	-
	SOF-GRZ-EBV (1)	-	-	-

Tabla 31: Descripción de los regímenes de AADs iniciados

SOF: sofosbuvir; LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina; SMV: simeprevir, PrOD: paritaprevir/ritonavir/ombitasvir/dasabuvir; GRZ: grazoprevir; EBV: elbasvir; PrO: paritaprevir/ritonavir/ombitasvir; VEL: velpatasvir; PegINT: interferón pegilado; DCV: daclatasvir.

En el momento del análisis, 285 de los 302 enfermos (94,4%), habían superado el final del tratamiento (FDT) y de ellos, hemos conseguido datos de RVS12 de 275 pacientes (275/302). Cuatro pacientes se perdieron durante el seguimiento (PDS) debido a una interrupción prematura debido a eventos adversos, 11 interrumpieron el tratamiento voluntariamente, 1 paciente fue PDS por cambio de ubicación, 8 alcanzaron el FDT pero fueron PDS antes de evaluar la RVS12 y 1 paciente falleció siete días antes del FDT. En un análisis modificado de intención de tratar (mITT), el 97,8% logró RVS12. Por genotipo,

todos los pacientes infectados con GT-3 y el 98,5% de los pacientes infectados con GT-1b lograron RVS12; mientras que, en GT-1a y GT-4 lograron el 97,1% y el 96,0% RVS12, respectivamente. Estos datos se han representado en la figura 22. Se observaron seis recidivas (tres pacientes infectados por GT-1a, uno GT-1b y dos GT-4). Ninguno de ellos era cirrótico y tres habían seguido tratamiento previo con INF. Todos ellos habían iniciado un régimen de AADs recomendado por las guías de tratamiento. Todos los pacientes con SARs basales lograron RVS12.

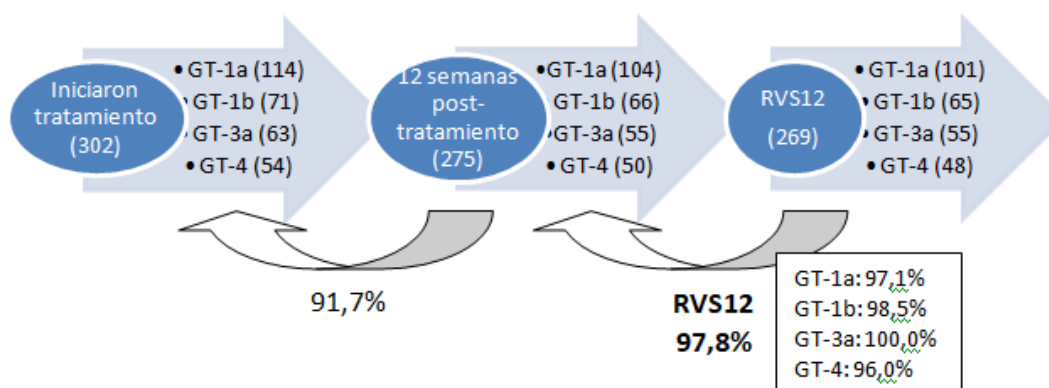


Figura 22: Análisis de eficacia según genotipo (mITT)

Para los pacientes infectados con el genotipo 1a, se ha realizado un análisis específico sobre las SARs de elbasvir. A diferencia de las SARs de clase en NS5A que se detectaron en 22 (9,8%) de los pacientes infectados con GT-1a, las SARs específicas de elbasvir se detectaron en sólo 12 pacientes; 5,4% [M28T (n=1), Q30DEHR (n=8), L31M (n=3)]. Estas diferencias entre unas SARs y otras se observaron igualmente en la población cirrótica: el 9,5% tenía SARs específicas de elbasvir, mientras que el 14,3% tenía SARs de clase en NS5A. Curiosamente, 158/210 pacientes tenían una carga viral superior a 800.000 UI/ml y, de éstos, sólo 8 (5,1%) tenían SARs específicas de elbasvir. Trece pacientes infectados por GT-1a en el estudio, iniciaron tratamiento con

grazoprevir-elbasvir guiado por SARs basales; a dos de ellos se les agregó ribavirina al régimen, y sólo tres recibieron un régimen de 16 semanas independientemente de la carga viral basal. Todos estos pacientes han logrado RVS12, excepto uno que fue PDS.

De manera similar, se ha realizado un análisis específico sobre las SARs de velpatasvir para los pacientes infectados con el genotipo 3. A diferencia de las SARs de clase en NS5A que se detectaron en el 6,4% de los pacientes (n=9), se detectaron SARs específicas de velpatasvir en 18 pacientes (12,7%); [A30K (n = 9), Y93H (n = 9)]. Se observaron diferencias similares entre las SARs de clase en NS5a y las SARs específicas de velpatasvir en la población cirrótica: 5/7 pacientes cirróticos (14,7% de la población cirrótica) tenían la SAR Y93H y SARs de clase en NS5A, y 8/11 pacientes cirróticos (23,5% de la población cirrótica) tenían SARs específicos de velpatasvir. Catorce pacientes cirróticos infectados por GT-3 de nuestro estudio, iniciaron un tratamiento con sofosbuvir-velpatasvir, guiado por SARs basales, 6 de ellos (42,8%) con ribavirina, a pesar de tener sólo dos, Y93H en el momento basal. Todos estos pacientes han logrado RVS12, excepto uno que fue PDS.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE REINFECCION vs RECIDIVA

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista *PlosOne*⁷⁵ y el artículo, entregado como parte de esta Tesis Doctoral.

Características demográficas y epidemiológicas de la población a estudio:

Basalmente, de los 53 pacientes incluidos en este estudio, la mayoría (41,5%) resultaron filogenéticamente genotipados como subtipo 1a. La distribución por genotipos se muestra en la figura 23.

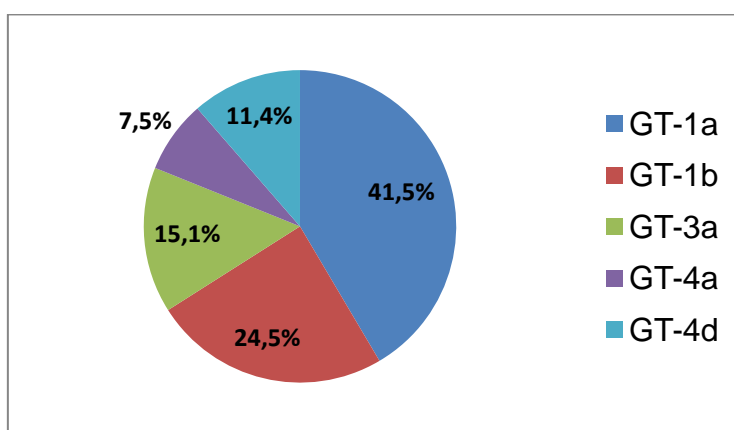


Figura 23: Distribución filogenética de subtipos

Se estudiaron los factores de riesgo de esta subpoblación y se observó que más de la mitad de los pacientes era coinfectado con VIH (60,4%). La vía de transmisión de la infección era conocida en gran parte de los pacientes (79,2%; 42/53), siendo aquellos pacientes en los que se desconoce, todos mono infectados.

Entre los que se conocía la vía de transmisión, fueron clasificados como adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), en el presente y/o en el pasado, un 78,6%; 33/42); de los cuales, el 51,5% (17/33) resultó infectado por el GT-1a⁷⁶ y, 27 de los 33 (81,8%), eran además coinfectados con VIH.

La transmisión de la infección del VHC a través de la vía sexual se dio en 7 pacientes, de los cuales 5 de ellos, eran HSH y los otros 2, heterosexuales; siendo en su totalidad coinfectados con VIH.

De los otros 2 pacientes con vía de transmisión conocida, uno de ellos tenía como único factor de riesgo una transfusión sanguínea durante la niñez y, el otro era un paciente hemodializado.

Discrepancias genotípicas del VHC mediante el análisis filogenético:

La obtención del genotipo y subtipo mediante el análisis filogenético a través de las herramientas utilizadas descritas en la metodología, ha concordado en más de la mitad de los casos, con la obtenida a través de los ensayos comerciales en las muestras basales (66,0%; 35/53). La mayoría de discrepancias obtenidas a partir de las técnicas comerciales han sido debidas a la asignación, por parte de estos ensayos, del genotipo sin información a nivel de subtipo. A pesar de ello, otras seis muestras basales resultaron erróneamente clasificadas a nivel de genotipo y/o de subtipo.

Para uno de los pacientes, se detectó una discordancia a nivel de subtipo. En la muestra basal, era genotipado como GT-1a según todos los

métodos analizados pero, en cambio, en la muestra del fallo (12 semanas post-tratamiento), era asignado como subtipo 1a ó 1b, en función de la región genética analizada y del método de genotipado utilizado. Realizando un análisis más exhaustivo, vemos que si concatenamos las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de los fragmentos NS5A y NS5B, el subtipado de esta muestra del momento del fallo de este paciente sería considerada VHC-1a y descartando la posibilidad de recombinación intersubtipos. De hecho, en ninguno de los 53 pacientes estudiados, se evidenció la existencia de recombinación genética utilizando las herramientas Simplot y RDP4, siendo además, evaluado a través de TreePuzzle.

Detección y evaluación de SARs:

En cuanto a la detección y evaluación de las SARs, ya sea de forma natural o sustituida bajo la presión selectiva del fármaco, se observó que los pacientes en este estudio albergaban principalmente variantes en los genes NS3 y NS5A, detectándose únicamente SARs en la posición 282 de NS5B en tres pacientes (S282T/R); dos de los cuales, también tenían SARs en NS5A. Hubo diez pacientes con variantes duales en NS3 y NS5A y se detectaron variantes únicas de NS3 y NS5A en 8 y 14 pacientes, respectivamente.

Los pacientes que se demostró que habían experimentado una reinfección se analizaron por separado. De ellos, quedó demostrado que cuatro de esos cinco pacientes adquirieron SARs en NS5A a lo largo del tratamiento, mientras que para uno de ellos, ya estaba presente una variante natural al inicio del estudio.

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

Los detalles sobre las variantes específicas se muestran con resumidas en la tabla 32.

Id. Paciente	Muestra	VHC-GT	VIH	Recidiva ó			
				Reinfección (por filogenia)	SARs NS3	SARs NS5A	SARs NS5B
Paciente 1	Basal	VHC-1b	No	Reinfección	-	93H	WT
	Fallo				56F	31V, 93H	WT
Paciente 2	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	31M	282R
Paciente 3	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	56F	-	WT
	Fallo				56F	WT	WT
Paciente 4	Basal	VHC-1b	Sí	Recidiva	WT	31M	WT
	Fallo				-	WT	WT
Paciente 5	Basal	VHC-4d	Sí	Reinfección	-	WT	-
	Fallo	VHC-3a			-	93H	WT
Paciente 6	Basal	VHC-4d	Sí	?	WT	93H	-
	Fallo				WT	30C, 93H	282T
Paciente 7	Basal	VHC-1a	Sí	?	-	WT	WT
	Fallo				168A/V	WT	WT
Paciente 8	Basal	VHC-1b	Sí	Recidiva	-	31M	WT
	Fallo				-	28T, 31M	WT
Paciente 9	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	56F	-	WT
	Fallo				56F, 168V	31M	WT
Paciente 10	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	30H	WT
Paciente 11	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	-	WT	WT

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

	Fallo				-	30R	WT
Paciente 12	Basal	VHC-4d	Sí	Recidiva	WT	WT	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 13	Basal	VHC-1b	?	Recidiva	-	31M	WT
	Fallo				56F, 80K, 117H, 122T, 170I	WT	WT
Paciente 14	Basal	VHC-4d	Sí	Reinfección	-	WT	WT
	Fallo	VHC-1a			174S	WT	WT
Paciente 15	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	-	31I/M, 93H	WT
	Fallo				-	31M, 93H	WT
Paciente 16	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	WT	WT	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 17	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	WT	WT	-
	Fallo				WT	30R	WT
Paciente 18	Basal	VHC-1b	No	Reinfección	-	WT	WT
	Fallo				-	31V, 93H	WT
Paciente 19	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	93H	WT
Paciente 20	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	174S	WT	-
	Fallo				168G, 174S	30R	WT
Paciente 21	Basal	VHC-4d	Sí	Recidiva	WT	-	WT
	Fallo				168V	-	WT
Paciente 22	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	174S	31M	-
	Fallo				174S	31M	WT

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

Paciente 23	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	174S	WT	-
	Fallo				174S	31F, 58N	WT
Paciente 24	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	WT	WT
Paciente 25	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	55I, 80K	WT	-
	Fallo				55I, 80K	31M, 58P	WT
Paciente 26	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	174S	WT	-
	Fallo				174S	WT	WT
Paciente 27	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				36M, 155K, 174S	28T	WT
Paciente 28	Basal	VHC-4a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	28V	WT
Paciente 29	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	WT	WT
Paciente 30	Basal	VHC-1b	No	Probable	117H	93H	-
	Fallo			Recidiva	-	31V, 93H	-
Paciente 31	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	WT	32A, 93H	-
	Fallo				WT	93H	-
Paciente 32	Basal	VHC-1b	No	Recidiva	-	93H	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 33	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	174S	WT	-
	Fallo				174G/S	WT	WT
Paciente 34	Basal	VHC-4d	Sí	Recidiva	WT	WT	-
	Fallo				WT	WT	282T
Paciente 35	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	WT	WT

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

	Fallo				-	WT	WT
Paciente 36	Basal	VHC-1a	Sí	Reinfección	174S	WT	WT
	Fallo	VHC-3a			-	30K	WT
Paciente 37	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	30K	WT
	Fallo				-	30K	WT
Paciente 38	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	WT	WT	-
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 39	Basal	VHC-4a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				WT	28M, 30R	WT
Paciente 40	Basal	VHC-3a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	WT	WT
Paciente 41	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	80K, 174S	WT	-
	Fallo				80K, 168V, 174S	30R	WT
Paciente 42	Basal	VHC-4a	Sí	Recidiva	WT	WT	WT
	Fallo				WT	WT	-
Paciente 43	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	WT	58D	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 44	Basal	VHC-4a	Sí	Recidiva	WT	WT	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 45	Basal	VHC-3a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	WT	WT
Paciente 46	Basal	VHC-1a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	30E	WT
Paciente 47	Basal	VHC-3a	No	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	93H	WT

Caracterización virológica de los pacientes tratados frente al virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa libres de interferón que no consiguen respuesta viral sostenida

Paciente 48	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	36L, 54S, 55I, 80L	30H, 58Y	-
	Fallo				36L, 54S, 55I, 80L	30H, 58Y	WT
Paciente 49	Basal	VHC-1b	Sí	Probable	-	WT	WT
	Fallo			Recidiva	-	WT	-
Paciente 50	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	170V, 174S	WT	WT
	Fallo				170V, 174S	WT	WT
Paciente 51	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	174S	WT	WT
	Fallo				174S	WT	WT
Paciente 52	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	WT	WT	WT
	Fallo				WT	WT	WT
Paciente 53	Basal	VHC-1a	Sí	Recidiva	-	WT	WT
	Fallo				-	WT	WT

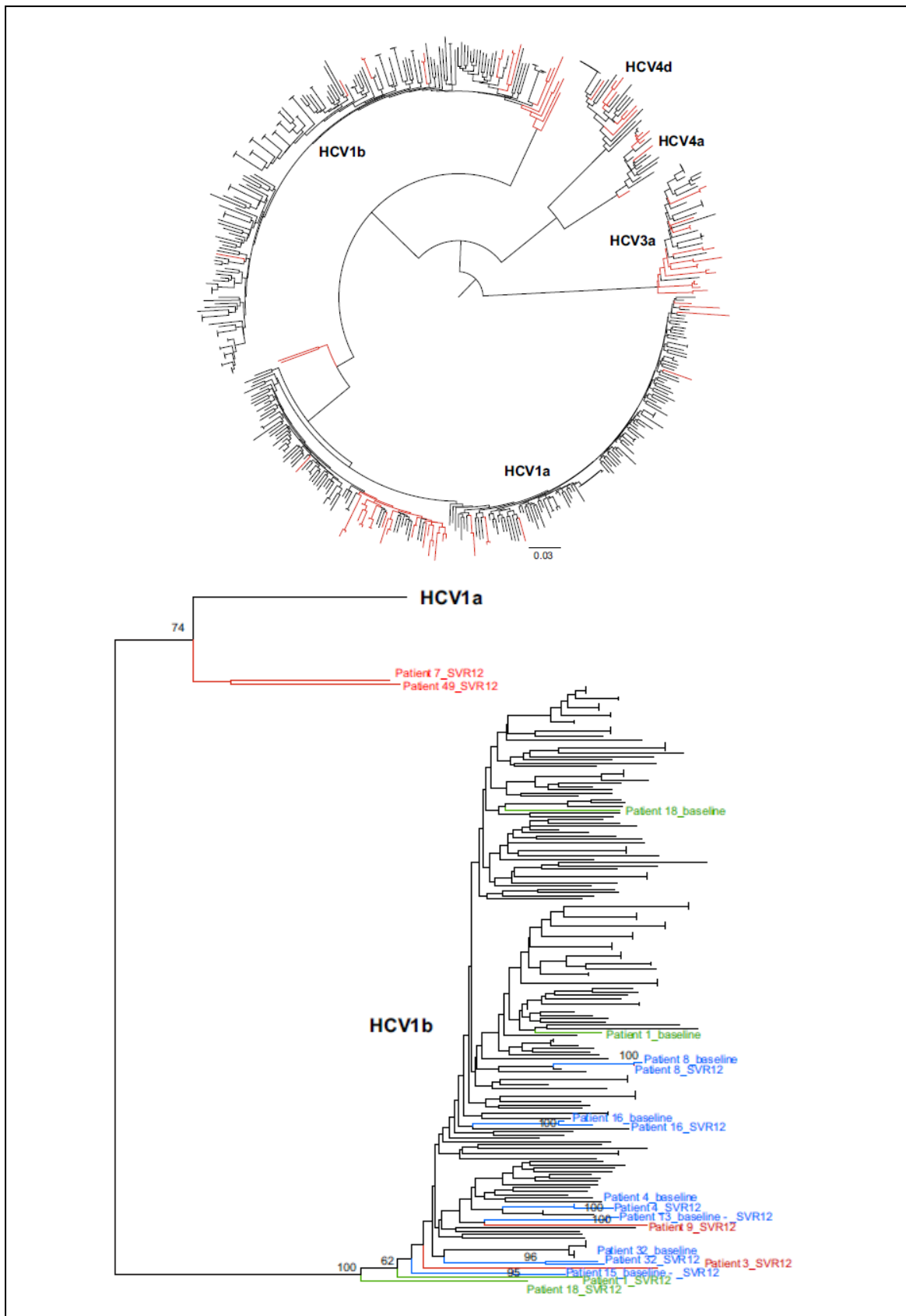
Tabla 32: Resumen de los resultados con distribución de SARs por paciente

Análisis filogenético de alineamientos concatenados:

Cuando se obtuvo una baja señal filogenética por haber sólo una región genética secuenciada, se secuenciaron los genes adicionales con carácter retrospectivo. Como resultado, hubo más de una región genética disponible para ambos puntos de tiempo muestreados (basal y fallo) para todos los pacientes, excepto en dos pacientes para los cuales la amplificación no fue exitosa para las regiones NS3 y NS5B, respectivamente (Id. pacientes 30 y 49). Por lo tanto, si bien el árbol sugirió la ocurrencia de una recaída, esta evidencia no fue concluyente, ya que los valores de *bootstrap* fueron <70%. Sin embargo,

para uno de los dos pacientes, la reinfección no es muy probable ya que este paciente se declaró infectado por una transfusión de sangre durante la infancia y no muestra una conducta de riesgo persistente para adquirir una nueva infección por el VHC.

Para todos los demás pacientes, se construyeron alineaciones concatenadas. La inferencia filogenética utilizando los cuatro alineamientos concatenados (NS3 - NS5A - NS5B, NS3 - NS5A, NS3 - NS5B y NS5A - NS5B) mostró que 44 de los 51 pacientes habían sufrido una recaída virológica, mientras que cinco (9,4%) se clasificaron como reinfectados con una cepa diferente del VHC. Para tres de estos cinco pacientes (Id. pacientes 5, 14 y 36), las secuencias al inicio del estudio (basal) y en el momento de la evaluación RVS12 (fallo) difirieron en el genotipo y/o subtipo de VHC. Los experimentos de NGS descartaron la aparición de una infección mixta al inicio del estudio y en el momento del fallo para los tres pacientes. Los otros dos pacientes (Id. pacientes 1 y 18) se reinfectaron con el mismo subtipo de VHC, agrupándose filogenéticamente en un clado diferente para los dos puntos de tiempo muestreados, como se muestra en la siguiente página, en la figura 24, en el árbol de los alineamientos concatenados de las regiones NS5A y NS5B, obtenido mediante el método de máxima verosimilitud (ML).

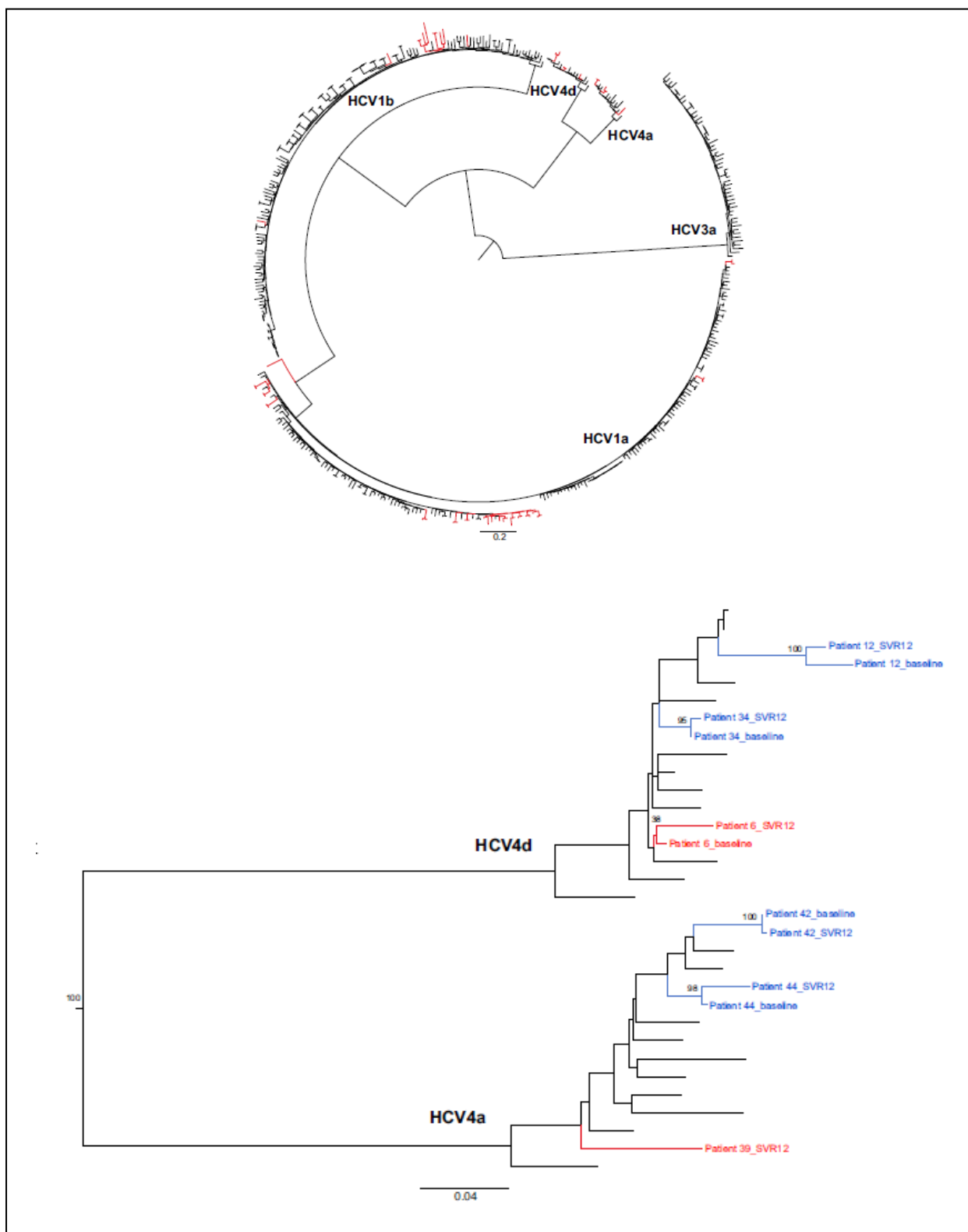


En la anterior figura (figura 24), se visualiza el árbol filogenético completo obtenido (superior) como el clado VHC-1b en detalle (inferior). El paciente 18, coloreado en verde, es un claro ejemplo de reinfección con una cepa diferente de VHC a pesar de tener el mismo subtipo ya que ambos virus, el detectado en el momento basal como en el momento del fallo, se agrupan en clados diferentes y alejados en el árbol, con un soporte de *bootstrap* del 100% para la segregación de los diferentes clados. Para el paciente 4, coloreado en azul, ambas cepas se agrupan con un alto valor de *bootstrap* (100%), lo que sugiere que este paciente experimentó una recaída virológica. Las réplicas de *bootstrap* solo se visualizan para los pacientes que experimentaron una recaída, todos indicados en azul. Los pacientes para los que sólo se incluye una secuencia en esta parte del árbol (inferior), ya sea basal o del fallo, están coloreados en rojo. La secuencia del fallo y la basal para los pacientes 7 y 49, respectivamente, se agrupan fuera del gran clado VHC-1b, lo que podría deberse a un evento potencial de recombinación. Sin embargo, los análisis detallados con TreePuzzle y RDP4 para los 53 pacientes no confirmaron ningún evento de recombinación. El análisis en profundidad de Simplot para estos dos pacientes (Id. 7 y 49) mostró que ambas cepas se clasificaron como VHC-1a. A pesar de la ausencia de evidencia de recombinación, no extrajimos ninguna conclusión con respecto a la ocurrencia de reinfección o recaída en el paciente 7.

De los cinco pacientes que se definieron como re infectados, tres se identificaron como ADVP, uno como HSH y del otro se desconoce la posible vía de transmisión. Tres de estos cinco pacientes están coinfectados con VIH.

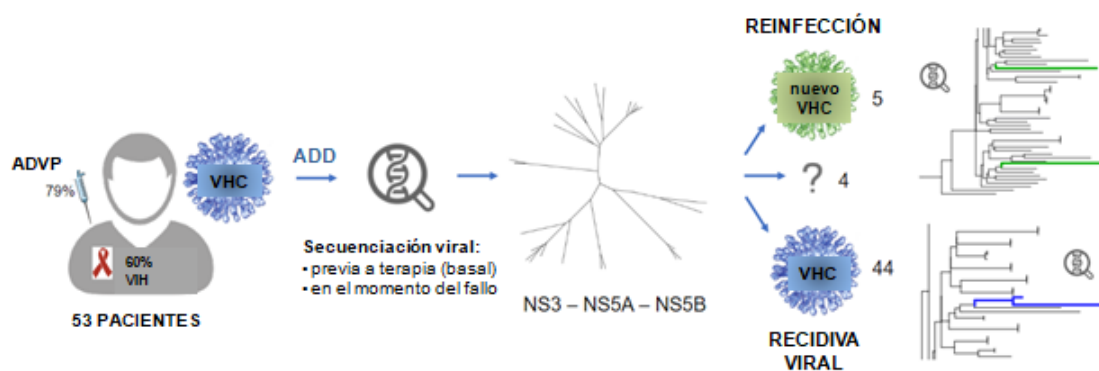
Para dos pacientes adicionales, no se pudieron extraer conclusiones por diferentes motivos; bien, a pesar de la agrupación cercana en el árbol de ambas cepas, el valor de *bootstrap* resultó inferior al 70%; o bien, debido a una

agrupación no concluyente entre los clados VHC-1a y VHC-1b (Id. pacientes 6 y 7). Se muestra con más detalle en la página siguiente, la figura 25., en la que se ve el árbol de máxima verosimilitud obtenido con los alineamientos concatenados de las regiones NS3 y NS5A; tanto el árbol completo (superior) como el clado VHC-4 [4a y 4d] (inferior). Sugiere que los grupos de pacientes de color azul han experimentado una recidiva, respaldada por valores de *bootstrap* >70%. Sin embargo, para el paciente 6, indicado en rojo, el valor fue de 38, lo que resulta en una falta de evidencia para distinguir entre una recaída y una reinfección. Para el paciente 39, ese fragmento NS3-NS5A aparece sólo en el momento del fallo.



Las conclusiones extraídas de los análisis filogenéticos no se vieron influenciadas por la eliminación de las posiciones asociadas a la resistencia al fármaco en las alineaciones.

Resumen gráfico del estudio:



DISCUSIÓN

El tratamiento de la hepatitis C crónica con AADs logra altas tasas de curación. El fallo virológico ocurre en menos del 5% de los pacientes tratados con AADs. En números absolutos, se necesita una terapia de segunda línea para lograr la erradicación viral en un número significativo de pacientes. Varias guías clínicas^{43,77} recomiendan en la nueva actualización del 2018, el uso de la combinación de tres fármacos: sofosbuvir, velpatasvir y voxilaprevir para el retratamiento.

Los datos preliminares sugieren que el régimen puede seleccionarse de acuerdo con las SARs detectadas contra los fármacos incluidos en el régimen fallido⁷⁸. En nuestro estudio, mostramos que el retratamiento guiado por resistencias junto con un informe interpretado alcanza tasas de eficacia cercanas al 90% en pacientes que fracasaron a un régimen basado en inhibidores de NS5A, que son los más difíciles de retratar. Ofrecemos recomendaciones sobre la selección del régimen de retratamiento basado en los hallazgos de resistencia detectados. Creemos que estas recomendaciones pueden ser de interés en aquellas situaciones en las que Vosevi® (sofosbuvir / velpatasvir / voxilaprevir) pueda no estar disponible.

Analizamos los fallos a regímenes basados en inhibidores de NS5A encontrados en la cohorte GEHEP-004. Este es el estudio de cohortes más grande realizado en España y uno de los más grandes estudios de cohortes internacionales sobre fallos a AADs. A pesar de que GEHEP-004 no incluye centros de todo el país, la distribución por genotipos que hemos analizado es similar a la distribución publicada por los estudios epidemiológicos de VHC moleculares españoles más recientes. De hecho, en el estudio GEHEP-005¹⁸, el estudio más grande y más reciente realizado en España, la distribución de genotipos de VHC para los años 2000-2015 fue de 66,9% para genotipo 1 (24,9% 1a y 37,9% 1b), 17,3% para genotipo 3 y 11,4% para genotipo 4;

mientras que en nuestro estudio, la distribución ha sido del 58,0% para el genotipo 1, 21,6% para genotipo el 3 y 14,7% para genotipo el 4. Esta distribución es consistente con los datos más recientes publicados en Europa^{79,80}.

Varios estudios han analizado el desarrollo de SARs en pacientes que fallan a tratamiento después de su primer régimen de ADDs⁸¹⁻⁸⁵. En concordancia con nuestro estudio, vemos que es habitual el desarrollo de SARs en pacientes que fallan a tratamientos que contienen inhibidores de NS5A, aunque las tasas de SARs fueron más bajas en nuestro estudio que en estos estudios referenciados. Junto con otros estudios recientes^{83,84,86}, nuestro estudio es uno de los primeros que muestra datos de resistencia, retratamiento y eficacia en regímenes basados en NS5A de primera línea. La gran mayoría de los pacientes de nuestra cohorte se volvieron a tratar con ribavirina y durante un período más prolongado (24 semanas) ya que los clínicos siguieron las recomendaciones de las versiones anteriores de las pautas de tratamiento de EASL disponibles en ese momento^{87,88}.

Realizamos un análisis en profundidad de cómo los pacientes fueron retratados para intentar orientar acerca de cómo utilizar los datos de resistencia y crear unas recomendaciones de retratamiento en función de los resultados obtenidos. Nos centramos en aquellos pacientes que no alcanzaron la RVS después del segundo tratamiento con AADs, considerando datos como cirrosis, coinfección por VIH y exposición previa a IFN, al ser factores pronósticos conocidos de baja respuesta a los regímenes de AADs convencionales.

En nuestra cohorte, los pacientes que fracasaron con un régimen basado en LDV, DCV o PrO±DSV sin SARs en NS5A, NS3 ó NS5B, que fueron

retratados con sofosbuvir + un inhibidor de NS5A + ribavirina durante 12/24 semanas, lograron altas tasas de RVS. Por lo tanto, el régimen de sofosbuvir + inhibidor de NS5A + ribavirina podría recomendarse para el tratamiento de pacientes que no presenten SARs. En el caso de tener disponibilidad a velpatasvir, éste debe ser el inhibidor de NS5A del nuevo régimen de retratamiento. Si no se tiene disponibilidad de acceso a velpatasvir, se podrá utilizar un inhibidor de NS5A convencional agregando ribavirina y extendiendo la duración a 24 semanas.

Para los pacientes que fracasaron con SARs sólo en NS5A, se consiguieron retratar con éxito la mayoría de los pacientes con genotipo distinto al GT-3, con un régimen de SOF/PrOD/RBV. Los regímenes basados en simeprevir con RBV y durante 24 semanas también fueron bastante efectivos, aunque se encontraron tasas subóptimas de RVS en pacientes con uno o más factores de respuesta baja, especialmente en pacientes cirróticos; por lo que, nuestra recomendación es que se eviten, siempre que sea posible, los regímenes basados en simeprevir, especialmente en pacientes con cirrosis. La mayoría de los pacientes infectados con genotipo 3 se volvieron a tratar y se curaron con un régimen basado en SOF + inhibidor NS5A + ribavirina durante 24 semanas o, un régimen de sofosbuvir más dos o tres fármacos inhibidores de distintas dianas, junto a ribavirina. Los enfermos en los que se detecte la SAR Y93H en NS5A, deberían ser retratados con un régimen de sofosbuvir + inhibidor NS5A + ribavirina durante 24 semanas. Como estas combinaciones pueden ser menos óptimas si el paciente es cirrótico, también se recomienda un régimen de sofosbuvir + 2 o 3 fármacos de distintas dianas + ribavirina, si es posible.

Finalmente, cuando se detectaron SARs tanto en NS5A como en NS3 en el momento del fallo, los pacientes se curaron con un régimen de tres fármacos basado en sofosbuvir, que también añadía ribavirina.

Respecto a las limitaciones del estudio, debemos reconocer que tiene varias limitaciones. En primer lugar, el estudio se ha realizado dentro de la cohorte española GEHEP-004, por lo tanto, nuestros datos pueden no ser representativos a nivel europeo. En segundo lugar, nuestro estudio puede no tener el poder suficiente para permitir que nuestras conclusiones se extrapolan; aunque hayamos incluido un gran número de pacientes y tenemos probablemente una de las cohortes más grandes de fallos a tratamiento de la hepatitis C con AADs, la gran variedad de genotipos, medicamentos, opciones de duración del tratamiento y el uso o no de ribavirina, conduce a un número limitado de pacientes en cada subgrupo. Además, hay que sumar la creciente aprobación y disponibilidad de fármacos que se ha dado durante el periodo del estudio, añadido a la adaptación de las recomendaciones de las guías clínicas al respecto. En consecuencia, la población del estudio es una población muy heterogénea que complica el análisis. Por lo tanto, considerado que la colaboración entre los investigadores que estudian diferentes grupos de resistencia puede ser necesaria para dar recomendaciones definitivas sobre la guía de resistencia. Otra limitación ha sido el método de interpretación de las SARs utilizado en nuestro estudio (Lontok et al.⁵⁶), el cual, como hemos mostrado en los resultados, puede haber omitido algunos hallazgos de resistencia importantes no descritos en ese momento⁷³. Por lo tanto, puede haberse infravalorado la detección de SARs al haber analizado las mutaciones en el momento de generar el informe de resistencias. Igual que recomienda la EASL, consideramos que el retratamiento basado en los hallazgos de resistencia debe realizarse en el contexto de un equipo multidisciplinar que incluya virólogos con un conocimiento profundo del impacto de las SARs en la versión más actualizada disponible así como la participación de clínicos con

experiencia en el tratamiento y manejo de estos pacientes. Por último, otra limitación del estudio es la referente a la reciente llegada de nuevas moléculas, como la combinación aprobada tras el periodo experimental de nuestro estudio, y que por lo tanto no hemos considerado, sofosbuvir / velpatasvir / voxilaprevir (Vosevi[®]), actualmente recomendada para el retratamiento de pacientes con un fallo terapéutico anterior. La posibilidad de que ésta u otra combinación que pueda venir en un futuro tenga mejores resultados que las moléculas consideradas en nuestro estudio puede hacer que los datos obtenidos queden desactualizados.

En conclusión, hemos demostrado que los hallazgos de resistencia junto con un informe interpretado permiten alcanzar tasas de RVS cercanas al 90%. Creemos que nuestros datos pueden ser de especial relevancia para aquellos países donde todavía no se dispone de nuevas combinaciones de medicamentos, como Vosevi[®], y pueden permitir el tratamiento de pacientes a un menor coste, evitando la interacción entre medicamentos y preservando el régimen de combinación de tres medicamentos. Nuestra hipótesis es que las tasas de RVS pueden incluso mejorarse si se discuten los datos de resistencia entre los virólogos experimentados y los clínicos que tratan.

A diferencia de la relación entre determinadas SARs y su impacto en la eficacia del (re)tratamiento en los pacientes que han fallado a una primera línea de tratamiento, en el caso de las pruebas de resistencia basales (antes del inicio del tratamiento del VHC con todos los regímenes orales de AADs) son todavía un tema de debate, al menos para ciertos escenarios. Aunque existe un consenso total de que no hay necesidad de realizar una prueba SARs basales en pacientes infectados por los genotipos 1b y 4, las pautas de tratamiento clínico^{43,44} todavía difieren en las recomendaciones para pacientes infectados por los genotipos 1a y 3.

En nuestro estudio se observaron tasas de eficacia muy altas en un inicio de tratamiento guiado por resistencias en todos los genotipos de VHC más prevalentes en España. Curiosamente, las tasas más bajas de RVS12 se encontraron para el genotipo 4 (96%) y las más altas para los pacientes infectados con genotipo 3 (100%).

Los pacientes infectados por los genotipos 1b (15,9%) y genotipo 4 (13,6%) fueron los menos prevalentes en nuestra cohorte. De hecho, esta es una de las limitaciones de nuestro estudio, ya que difiere de la prevalencia de GT-1b y GT-4 descrita en España y Europa⁷⁹. Estos pacientes también se encontraban en las fases iniciales de nuestro estudio, cuando el papel clínico de las pruebas de resistencia basales no se limitaba a los genotipos 1a y 3. Sin embargo, sólo un paciente infectado por el genotipo 1b y dos pacientes infectados por el genotipo 4 no lograron RVS12 en nuestra cohorte [RVS12 del 98,5% (65/66) y 96,0% (48/50), respectivamente].

Nuestro estudio también describe la prevalencia de SARs en NS5A en genotipos de VHC en España y confirma, como otros estudios anteriores⁸⁹, que el genotipo 1b alberga las tasas más altas de prevalencia de SARs (28%). El genotipo 4 fue el genotipo de VHC con la tasa más baja de detección de SARs clínicamente relevantes (3%). Es de destacar que estos datos pueden estar sesgados por el hecho de que hayamos utilizado el consenso de Lontok de 2015⁵⁶ para la evaluación de las SARs clínicamente significativas y, en ese momento, el conocimiento sobre los SARs de GT-4 era más escaso.

El genotipo 1a es el segundo genotipo en prevalencia en España¹⁸, pero fue el más frecuente en nuestra cohorte. Esto nos permitió generar datos muy sólidos sobre la prevalencia de SARs clínicamente relevantes en los aislados de VHC GT-1a españoles y la eficacia basal guiada por resistencia del

tratamiento de primera línea de este genotipo. Dado que grazoprevir / elbasvir fue aprobado para el tratamiento con GT-1a durante el período de estudio, también pudimos generar datos interesantes sobre su uso en España, y cómo los médicos se adherieron a las distintas guías clínicas. Equivalentemente a un estudio anterior que describe la prevalencia de SARs en pacientes de ensayos clínicos en Europa⁸⁹, la prevalencia de SARs de interés clínico, en el genotipo 1a fue baja en nuestra cohorte: sólo 22 pacientes (9,9%) tuvieron alguna en NS5A y 14 (6,3%) en NS3, según el consenso de Lontok⁵⁶. En cuanto a los datos de ensayos clínicos⁹⁰, curiosamente, en nuestra cohorte de vida real, el número de pacientes que albergan alguna SARs específica para elbasvir fue incluso menor (n=12; 5,4%). Estos hallazgos tuvieron un alto impacto en el uso de grazoprevir / elbasvir, ya que nuestra cohorte, siguió principalmente las pautas de AASLD en lugar de las de EASL. De hecho, mientras que el 75% de los pacientes con genotipo 1a en nuestra cohorte tenían una carga viral superior a 800.000 UI/ml, sólo el 27% de los pacientes que iniciaron grazoprevir/elbasvir siguió un régimen de ribavirina de al menos 16 semanas. La eficacia basal guiada por resistencias fue muy alta en nuestra cohorte de genotipo 1a en la vida real: la RVS12 se logró en 101/104 pacientes (97,1%). Los datos de vida real para la eficacia guiada por resistencias basales son escasos. Cento et al⁸³ describieron un subconjunto de pacientes infectados con genotipo 1a en la práctica clínica, en la que alcanzaron un índice de RVS del 100,0% con tratamiento guiado por SARs basales.

Otro genotipo con gran representación en nuestra cohorte es el genotipo 3, con un 27,3%. Creemos que esto ha sido debido a la influencia de las guías clínicas de la AASLD⁹¹, que recomiendan la detección de SARs basales en los pacientes cirróticos infectados por el genotipo 3, para decidir si es necesario agregar ribavirina a la combinación sofosbuvir/velpatasvir. Esta alta prevalencia de pacientes con genotipo 3 en nuestra cohorte, nos ha permitido obtener datos sólidos sobre la prevalencia de SARs clínicamente relevantes así como,

la eficacia guiada por resistencias basales del tratamiento de primera línea en los aislados de VHC genotipo 3 circulantes en España. Nuevamente, igual que en caso de las SARs de clase para NS5A y elbasvir en genotipo 1a, en el genotipo 3, la prevalencia de SARs de clase para NS5A fue mayor (n = 27; 19%) que la de SARs específicas de velpatasvir. Curiosamente, solo en 9 pacientes (6%) se detectó la SAR Y93H en la muestra basal (previa a tratamiento), con un aumento del 15% en los pacientes cirróticos con GT3. Estos números son ligeramente más altos que los publicados en otros estudios en España⁹² y Europa⁹³. También encontramos que otros 9 pacientes presentaron cambios A30KS en NS5A. Estos cambios, especialmente A30K, tienen un alto impacto en la eficacia de glecaprevir/pibrentasvir^{73,94}. De hecho, las directrices españolas más recientes^{49,51} recomiendan una duración de glecaprevir/pibrentasvir de 12 semanas si estas variantes están presentes basalmente en VHC genotipo 3. Como en el estudio de Cento et al⁸³, en nuestra cohorte se ha observado un 100,0% de eficacia guiada por resistencias basales en este genotipo 3 en vida real, es decir, se alcanzó RVS12 en los 55 pacientes que llegaron a ese punto de evaluación, incluso en aquellos pacientes cirróticos (21/53; 39,6%).

Además de las limitaciones ya descritas, hemos detectado algunas otras: en primer lugar, el diseño del estudio, que es un solo brazo sin un brazo comparativo que carezca de información de resistencia. En segundo lugar, no todos los pacientes que se sometieron a una prueba de resistencia basal iniciaron finalmente tratamiento; sin embargo, como las restricciones para priorizar el tratamiento para pacientes con F3-F4 estuvieron disponibles durante la mayor parte del periodo del estudio, creemos que los pacientes menos favorables son los que se han incluido aquí. Finalmente, y lo más importante, es que incluso presentando aquí una de las cohortes de vida real más numerosas que abordan el impacto del tratamiento guiado por resistencias en pacientes no tratados previamente, creemos que el número de pacientes

incluidos para cada genotipo puede ser demasiado pequeño para extraer conclusiones definitivas y que para ello, sería necesaria la colaboración con otras cohortes de vida real internacionales.

Si observamos los resultados obtenidos en la subcohorte estudiada con muestras en paralelo y mediante el empleo de métodos filogenéticos para la discriminación entre recidiva y reinfección, vemos que la tasa relativamente alta de fracaso de la terapia se puede atribuir al uso de regímenes inferiores durante las primeras etapas de los AADs en 2014, y debido a la determinación incorrecta de genotipos de VHC mediante ensayos comerciales, lo que puede resultar en la elección de un posible régimen subóptimo.

Las tasas de reinfección en situaciones de la vida real pueden ser subestimadas, especialmente cuando el paciente se re infecta con el mismo subtipo. Con este estudio informamos cómo se necesita un análisis filogenético detallado para discriminar la reinfección intrasubtipo de la recidiva. Este trabajo demuestra la importancia de la secuenciación genética, no sólo para definir el (re)tratamiento más apropiado, sino también para realizar la filogenia necesaria para determinar el genotipo y subtipo del VHC correcto con el que está infectado un paciente y para distinguir entre la recidiva y la reinfección.

Los genes concatenados se utilizaron para distinguir entre la recidiva y la reinfección, sin embargo, para dos pacientes no se pudo extraer ninguna conclusión debido, bien a la obtención de un valor de *bootstrap* <70% del respectivo clado o, por agrupación inconsistente entre diferentes subtipos de VHC, respectivamente.

Para el resto de los enfermos, la mayoría tuvo una recidiva viral (44/49). Estos pacientes son dianas (elegibles) para el retratamiento. Hasta hace poco, se recomendaba elegir el régimen AADs en función de la presencia de SARs naturales o emergentes^{48,77,95}. Desde la aprobación de las nuevas combinaciones que consisten en sofosbuvir, velpatasvir y voxilaprevir, y glecaprevir y pibrentasvir, las pautas de AASLD y EASL ya no recomiendan rutinariamente las pruebas de SARs en caso de fracaso. Además, en la era de las verdaderas combinaciones pangénóticas, el interés de determinar el genotipo del VHC basal está disminuyendo a medida que el régimen prescrito ya no depende de él. Nuestra hipótesis es que en los países desarrollados donde los regímenes de primera línea consistirán en las combinaciones de terapias más nuevas, el genotipado inicial se considerará obsoleto.

Se encontró que casi el 10% de los pacientes (5/53) estaban reinfectados con una cepa diferente del VHC; dos de los cuales (40% de las reinfecciones ó el 3,8% de todos los pacientes) podrían no haberse detectado de no ser por el análisis filogenético ya que, las secuencias del momento previo al inicio de tratamiento y del momento del fallo coincidían en el mismo subtipo de VHC. El análisis filogenético confirmó la reinfección en tres pacientes con genotipo o subtipo discordante. Tres de estos cinco pacientes reinfectados eran o habían sido ADVP, mientras que otro tenía como factor de riesgo, ser HSH. Del quinto paciente no se conocía ninguna vía de transmisión. Además, se sabía que tres de ellos estaban coinfectados con el VIH. Se ha descrito que determinados materiales, prácticas y artilugios utilizados durante, antes o después de la actividad sexual⁹⁶, el comportamiento sexual de alto riesgo en general^{97,98}, así como el uso de drogas^{99,100}, podrían estar asociados a un mayor riesgo de transmisión de VHC, mostrando un papel potencial de comportamiento de riesgo multifactorial en lugar de transmisión a través de una vía dominante.

La principal limitación de este estudio ha sido que no fue diseñado específicamente para evaluar las tasas de reinfección, sino que el objetivo principal de la cohorte GEHEP-004 era evaluar la aparición de SARs en el fallo virológico. Además, la selección de 53 pacientes de una cohorte de unos 450, puede haber introducido un sesgo en el análisis basado en la población; sin embargo, éstos fueron los únicos pacientes para los cuales se disponía de muestras en los dos puntos temporales (basales y fallo) en el momento en que se planteó realizarlo. Dado que se trataba de un grupo aleatorio de 53 pacientes, las características generales no diferían en gran medida de los del resto de la cohorte. La información completa sobre el riesgo de transmisión no está disponible para el resto de pacientes de la cohorte, lo que no nos permite evaluar el alcance de este posible sesgo. Además, se observó que una gran parte de la población del estudio (>60%) estaba coinfectada con VIH, que es mucho más alta que la informada para la población infectada con VHC en general en España¹⁸. Sin embargo, creemos que estas limitaciones no tuvieron un gran impacto en nuestra conclusión principal, apoyando el valor agregado de la filogenia para descartar la reinfección intrasubtipo.

Varios genes del genoma del VHC han sido sometidos a análisis filogenéticos, con los genes de la envoltura E1 y E2 dominando el panorama del estudio^{101,102}, más particularmente la región 1 hipervariable, ya que esta región se caracteriza por una alta tasa de evolución¹⁰³. Sin embargo, en el contexto del seguimiento del tratamiento, estos genes no se secuencian de forma rutinaria, a diferencia de las proteínas NS3, NS5A y NS5B. A pesar del beneficio de una señal filogenética más alta, el valor agregado del uso de secuencias genéticas virales obtenidas en la práctica clínica supera el uso de un gen con mayor filogenia, como E2, al menos en el contexto de nuestro estudio. Además, estudios recientes tienden a usar con más frecuencia los

genes NS3, NS5A y / o NS5B con fines filogenéticos, aunque están asociados a un menor grado de variabilidad genética^{104,105}.

Se necesitan regiones más largas, como los genomas de longitud completa, para obtener filogenias más robustas, ya que la mayoría de las veces este enfoque mejora mucho la señal filogenética^{101,102,104}. Cuando se concatenan múltiples genes, se ha propuesto combinar regiones caracterizadas por una tasa evolutiva diferente para aumentar la capacidad de identificar cadenas de transmisión¹⁰⁶, mientras que otras subrayan que no existe un gen definitivo para realizar análisis evolutivos de virus genéticamente diversos¹⁰⁷. Afortunadamente, dado que el VHC rara vez se recombina¹⁰⁸, al menos estudiado a nivel intergenotipo o intersubtipo, los análisis exhaustivos que utilizan múltiples genes aún deben tener una representatividad de todo el genoma. En nuestro conjunto de datos, no vimos recombinación, ni inter- ni intragenotipo ni subtipo.

Menos del 70% de las asignaciones de genotipos de VHC por ensayos comerciales parecían ser consistentes con herramientas de subtipo bien conocidas y análisis filogenético. A pesar de que la mayoría de las discrepancias por ensayos comerciales se debieron a una asignación incompleta en el nivel de subtipo, hubieron seis muestras basales (11,3%) que se clasificaron erróneamente a nivel de genotipo y/o de subtipo, lo que podría haber dado lugar a la elección de un régimen menos eficaz de AADs; añadido a que estos pacientes fueron tratados entre 2014 y 2016, con regímenes algo menos eficaces que los disponibles recientemente. Se sabe que los ensayos comerciales no son confiables en el caso de infecciones mixtas o eventos de recombinación, ya que solo se dirigen a una región limitada del genoma del VHC. Las inconsistencias entre los ensayos comerciales y la secuenciación genética seguidas de la filogenia como herramienta de genotipado del VHC

también se han descrito en ausencia de recombinación, que oscilan alrededor del 10% de las clasificaciones erróneas del genotipo/subtipo^{14,15,109}. Este estudio confirma el valor agregado de la secuenciación genética junto con (o potencialmente en lugar de) el uso de ensayos comerciales en la evaluación de los genotipos del VHC, así como para adquirir información adicional sobre la presencia de SARs que han demostrado reducir la susceptibilidad a ciertos antivirales¹¹⁰. En particular, la NGS se realizó en las muestras de ambos puntos temporales de los pacientes identificados como reinfectados, para descartar la presencia de una infección mixta, ya que los estudios en la era pre-AADs han demostrado que la aparición de nuevas cepas virales tras el fallo de la terapia es, a menudo, asociado con el predominio emergente de variantes minoritarias preexistentes en lugar de una reinfección real¹¹¹.

La observación de que una gran parte de las infecciones se asignó a GT1 (66,0%) concuerda con un gran estudio español sobre la prevalencia y distribución del genotipo del VHC¹⁸. Sin embargo, en nuestro estudio, una mayor proporción de casos se infectó con VHC-1a y VHC-4 en comparación con los de esta cohorte nacional; posiblemente debido a la diferencia en las características de la población, ya que nuestro estudio tiene una mayor proporción de pacientes coinfectados con VIH/VHC (60,4% frente a 19,1%). Para estos pacientes, tanto la adicción a drogas por vía parenteral como la transmisión sexual, se han definido como las principales vías de transmisión, para las cuales se informó una mayor proporción de infecciones por VHC-1a y VHC-4, en comparación con la población general¹⁸. Especialmente, el VHC-1a se observa con mayor frecuencia entre los ADVP infectados por el VHC¹¹². Se informó que la mayoría de los pacientes en este estudio estaban infectados a través de esta vía de transmisión, de acuerdo con un aumento de la epidemia de VHC dominada por ADVP, como fue descrita anteriormente¹¹³. Todos los pacientes para los cuales se desconocía la ruta de transmisión, se identificaron como monoinfectados por el VHC, lo que destaca el valor agregado de capturar

información sobre la vía potencial de transmisión, como se hizo en la atención clínica del VIH.

En esta cohorte de pacientes tratados sin éxito, la mayoría experimentó un verdadero fallo a AADs (recidiva). Como aproximadamente la mitad de los reinfectados mostraron el mismo subtipo en el momento del fallo que en la muestra basal, cabe destacar la necesidad de un análisis filogenético, no sólo para determinar el genotipo correcto del VHC, sino también para distinguir entre la recidiva y reinfección. Dado que el 11,3% de los genotipos se clasificaron incorrectamente mediante ensayos comerciales y que el 3,8% tuvo una reinfección del mismo subtipo detectable sólo por filogenia, la probabilidad de clasificar erróneamente una reinfección como un fallo podría ascender entorno al 15%.

FINANCIACIÓN

MEDIOS Y FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido apoyado por subvenciones del Fondo de Investigación Sanitaria (www.isciii.es) (PI15 / 00713), Plan Nacional de I + D + I y Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER ([www.redes / redes / inicio](http://www.redes.net)) (RD16 / 0025/0040), Fundación Progreso y Salud, Junta de Andalucía (<http://www.juntadeandalucia.es/fundacionprogresoysalud/es>) (PI-0411-2014), y GEHEP-SEIMC (GEHEP-004).

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo han sido las siguientes:

- El retratamiento guiado por resistencias junto con un informe interpretado, alcanza tasas de eficacia cercanas al 90% en pacientes que fracasaron a un régimen basado en inhibidores de NS5A, que son los más difíciles de retratar.
- Las recomendaciones sobre la selección del régimen de retratamiento basado en los hallazgos de resistencia detectados pueden ser de interés en aquellas situaciones en las que Vosevi® (sofosbuvir / velpatasvir / voxilaprevir) pueda no estar disponible.
- El régimen de sofosbuvir + inhibidor de NS5A + ribavirina podría recomendarse para el tratamiento de pacientes que no presenten SARs. En el caso de tener disponibilidad a velpatasvir, éste debe ser el inhibidor de NS5A del nuevo régimen de retratamiento.
- Para los pacientes que fracasaron con SARs sólo en NS5A, se consiguieron retratar con éxito la mayoría de los pacientes con genotipo distinto al GT-3, con un régimen de SOF/PrOD/RBV. Para GT-3, un régimen basado en SOF + inhibidor NS5A + ribavirina durante 24 semanas ó, un régimen de sofosbuvir más dos o tres fármacos inhibidores de distintas dianas junto a ribavirina, han mostrado una excelente eficacia.
- Cuando se detectaron SARs tanto en NS5A como en NS3 en el momento del fallo, los pacientes se curaron con un régimen de tres fármacos basado en sofosbuvir, que también añadía ribavirina.
- En nuestro estudio de detección de resistencias basales, se observaron tasas de eficacia muy altas en un inicio de tratamiento guiado por resistencias en todos los genotipos de VHC más prevalentes en España.
- Incluso presentando aquí una de las cohortes de vida real más numerosas que abordan el impacto del tratamiento guiado por resistencias en pacientes no tratados previamente, creemos que el

número de pacientes incluidos para cada genotipo puede ser demasiado pequeño para extraer conclusiones definitivas y que para ello, sería necesaria la colaboración con otras cohortes de vida real internacionales.

- Respecto al estudio de muestras en paralelo, se demostró que la mayoría experimentaron verdaderas recidivas y que, aproximadamente la mitad de los re infectados, mostraron el mismo subtipo en el momento del fallo que en la muestra basal.
- Por último, cabe destacar la necesidad de un análisis filogenético, no sólo para determinar el genotipo correcto del VHC, sino también para distinguir entre recidiva y reinfección.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosman, C. *et al.* Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. *Res. Virol.* **149**, 311–4
2. Ishida, S. *et al.* Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol. Res.* **20**, 335–347 (2001).
3. Kaito, M. *et al.* Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* **75**, 1755–1760 (1994).
4. Koutsoudakis, G. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol. Hepatol.* **36**, 280–293 (2013).
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification. (Accessed: 16th February 2019)
6. Houghton, M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* **29**, 82–88 (2009).
7. Friebe, P. & Bartenschlager, R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.* **76**, 5326–38 (2002).
8. Popescu, C.-I. *et al.* NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathog.* **7**, e1001278 (2011).
9. Torres-Puente, M. *et al.* Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J. Viral Hepat.* **15**, 188–199 (2007).
10. Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. & Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **61**, S45-57 (2014).
11. Smith, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–27 (2014).
12. Bukh, J. *The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals*

- unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control.* (2016). doi:10.1016/j.jhep.2016.07.035
13. Borgia, S. M. *et al.* Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J. Infect. Dis.* **218**, 1722–1729 (2018).
 14. Chueca, N. *et al.* Using NS5B Sequencing for Hepatitis C Virus Genotyping Reveals Discordances with Commercial Platforms. *PLoS One* **11**, e0153754 (2016).
 15. Fernández-Caballero, J. A., Alvarez, M., Chueca, N., Pérez, A. B. & García, F. The cobas® HCV GT is a new tool that accurately identifies Hepatitis C virus genotypes for clinical practice. *PLoS One* **12**, (2017).
 16. Alazard-Dany, N., Denolly, S., Boson, B. & Cosset, F.-L. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses* **11**, 30 (2019).
 17. *Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017 Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.* (2017). doi:10.1149/2.030203jes
 18. Aguilera, A. *et al.* Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *J. Viral Hepat.* **24**, 725–732 (2017).
 19. Blach, S. *et al.* Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 161–176 (2017).
 20. Ramos-Casals, M. Manifestaciones extrahepáticas en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C. *Reumatol. Clínica* **5**, 71–75 (2009).
 21. RAMOS-CASALS, M. *et al.* Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. *J. Intern. Med.* **257**, 549–557 (2005).
 22. Chen, S. L. & Morgan, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 47–52 (2006).

23. Buti, M. ¿Es el tipo de interferón pegilado importante en la respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica C? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**, 125–126 (2008).
24. Morillas, R. M., Masnou, H., Ardévol, M. & López, D. Role of ribavirin in interferon-free therapy for the treatment of hepatitis C virus. *Gastroenterol. Hepatol.* **40**, 699–708 (2017).
25. Manns, M. P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet (London, England)* **358**, 958–65 (2001).
26. Fried, M. W. *et al.* Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002).
27. Hadziyannis, S. J. & Papatheodoridis, G. V. Peginterferon-alpha2a (40 kDa) for chronic hepatitis C. *Expert Opin. Pharmacother.* **4**, 541–51 (2003).
28. Casanova Rituerto Teresa Casanovas Taltavull, A. *HEPATITIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.*
29. Chueca Porcuna, N. *Evaluación de los métodos de genotipado del virus de la hepatitis C y la detección del polimorfismo Q80K del gen NS3 para pacientes naive a los nuevos antivirales de acción directa.*
30. AEMPS. *Informe de posicionamiento terapéutico de Boceprevir y Telaprevir.*
31. Consejería de Salud y Bienestar Social (AETSA). *Criterios y recomendaciones de uso de los inhibidores de la proteasa (boceprevir y telaprevir) para el tratamiento de la hepatitis C.*
32. Servicio Andaluz de Salud. *Comisión de Farmacia y Terapéutica. Dispensación de Boceprevir y Telaprevir.*
33. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de Simeprevir (Olysio®).*
34. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de Viekirax® (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) y Exviera® (dasabuvir).*
35. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de elbasvir y grazoprevir (Zepatier®) en hepatitis C crónica.*

36. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de glecaprevir/pibrentasvir (Maviret®) en hepatitis C.*
37. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (Vosevi®) en hepatitis C.*
38. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de Daclatasvir (Daklinza®).*
39. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de ledipasvir/sofosbuvir (Harvoni®).*
40. Gottwein, J. M. *et al.* Efficacy of NS5A Inhibitors Against Hepatitis C Virus Genotypes 1-7 and Escape Variants. *Gastroenterology* **154**, 1435–1448 (2018).
41. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de sofosbuvir/velpatasvir (Epclusa®) en hepatitis C.*
42. AEMPS. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de Sofosbuvir (Sovaldi®).*
43. Chung, R. T. *et al.* Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDSA Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* **67**, 1477–1492 (2018).
44. Pawlotsky, J.-M. M. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* **69**, 461–511 (2018).
45. Bertoli, A. *et al.* Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1–4 in Italy. *Sci. Rep.* **8**, 8988 (2018).
46. Bagaglio, S., Uberti-Foppa, C. & Morsica, G. Resistance Mechanisms in Hepatitis C Virus: implications for Direct-Acting Antiviral Use. *Drugs* **77**, 1043–1055 (2017).
47. Pérez, A. B., Chueca, N. & García, F. Resistance testing for the treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: When and for how long? *GERMS* **7**, (2017).
48. Cuypers, L. *et al.* Impact of HCV genotype on treatment regimens and drug resistance: a snapshot in time. *Rev. Med. Virol.* **26**, 408–434 (2016).

49. Calleja, J. L. *et al.* *Guía AEEH-SEIMC de tratamiento de la infección por virus de la Hepatitis C 2018* Coordinadores y redactores: Redactores: Panel de Expertos. (2018).
50. Organización Mundial de la Salud. *GUIDELINES FOR THE CARE AND TREATMENT OF PERSONS DIAGNOSED WITH CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION*. (2018).
51. Aguilera, A. *et al.* *Recomendaciones de GEHEP para el tratamiento de la hepatitis C. Marzo 2018. Miembros del panel*.
52. Mizquierdo. *MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD SECRETARIA GENERAL DE SANIDAD Y CONSUMO*.
53. Nacional De Salud, S. *Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en Octubre 2018*.
54. Razavi, H. *et al.* Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 325–336 (2017).
55. Organización Mundial de la Salud. *Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021*. (2016).
56. Lontok, E. *et al.* REVIEW Hepatitis C Virus Drug Resistance–Associated Substitutions: State of the Art Summary. *Hepatology* 1–10 (2015). doi:10.1002/hep.27934
57. Bartlett, S. R. *et al.* Sequencing of Hepatitis C Virus for Detection of Resistance to Direct-Acting Antiviral Therapy : A Systematic Review. **00**, 1–12 (2017).
58. Geno2pheno hcv. Available at: <https://hcv.geno2pheno.org/>. (Accessed: 9th February 2019)
59. Kalaghatgi, P. *et al.* Geno2pheno[HCV] – A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS One* **11**, e0155869 (2016).
60. BioAfrica - Oxford HCV Subtyping Tool Web Interface. Available at: <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/html/indexhcv.html>.

(Accessed: 9th February 2019)

61. COMET (Context-based Modeling for Expeditious Typing). Available at: <https://comet.lih.lu/index.php?cat=hcv>. (Accessed: 9th February 2019)
62. Quer, J. *et al.* High-Resolution Hepatitis C Virus Subtyping Using NS5B Deep Sequencing and Phylogeny, an Alternative to Current Methods. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 219–226 (2015).
63. Cristina, J. & Colina, R. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Viol. J.* **3**, 53 (2006).
64. Lole, K. S. *et al.* Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* **73**, 152–60 (1999).
65. Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421 (2009).
66. Boratyn, G. M. *et al.* BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* **41**, W29-33 (2013).
67. Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–4 (2010).
68. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
69. Martin, D. P., Murrell, B., Khoosal, A. & Muhire, B. Detecting and Analyzing Genetic Recombination Using RDP4. *Methods Mol. Biol.* **1525**, 433–460 (2017).
70. Schmidt, H. A. & von Haeseler, A. Maximum-Likelihood Analysis Using TREE-PUZZLE. in *Current Protocols in Bioinformatics* (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/0471250953.bi0606s17
71. Liu, K., Linder, C. R. & Warnow, T. RAxML and FastTree: Comparing Two Methods for Large-Scale Maximum Likelihood Phylogeny Estimation. *PLoS One* **6**, e27731 (2011).
72. Messina, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus

- genotypes. *Hepatology* **61**, 77–87 (2015).
73. Sorbo, M. C. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist. Updat.* **37**, 17–39 (2018).
74. Hézode, C. *et al.* Retreatment with sofosbuvir and simeprevir of patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4 who previously failed a daclatasvir-containing regimen. *Hepatology* **63**, 1809–16 (2016).
75. Cuypers, L. *et al.* Relapse or reinfection after failing hepatitis C direct acting antiviral treatment: Unravelling by phylogenetic analysis. *PLoS One* **13**, (2018).
76. Pérez, A. B. *et al.* Increasing importance of European lineages in seeding the Spanish hepatitis C virus subtype 1a epidemic. *Eurosurveillance In Press*, (2019).
77. Pawlotsky, J.-M. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018 q. *J. Hepatol.* (2018). doi:10.1016/j
78. Vermehren, J. *et al.* Retreatment of Patients who Failed Daa-Combination Therapies: Real-World Experience from a Large Hepatitis C Resistance Database. *J. Hepatol.* **64**, S188 (2016).
79. Kartashev, V. *et al.* New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. *J. Clin. Virol.* **81**, 82–9 (2016).
80. Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G. & Cacciapuoti, C. Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. *Infect. Agent. Cancer* **11**, 53 (2016).
81. Fourati, S. *et al.* Viral kinetics analysis and virological characterization of treatment failures in patients with chronic hepatitis C treated with sofosbuvir and an NS5A inhibitor. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47**, 665–673 (2018).
82. Dietz, J. *et al.* Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology* **154**, 976–988.e4 (2018).

83. Cento, V. *et al.* Optimal cure rate by personalized HCV regimens in real-life: a proof-of-concept study. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 3420–3424 (2017).
84. Di Maio, V. C. *et al.* Frequent NS5A and multiclass resistance in almost all HCV genotypes at DAA failures: What are the chances for second-line regimens? *J. Hepatol.* **68**, 597–600 (2018).
85. Milazzo, L. *et al.* Short article: Retreatment of chronic hepatitis C virus infection after unsuccessful therapy with all-oral direct-acting antiviral regimens: a real-life experience. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **29**, 1231–1234 (2017).
86. Dietz, J. *et al.* Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology* **154**, 976–988.e4 (2018).
87. European Association for Study of Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J. Hepatol.* **63**, 199–236 (2015).
88. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J. Hepatol.* **66**, 153–194 (2017).
89. Zeuzem, S. *et al.* NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J. Hepatol.* **66**, 910–918 (2017).
90. Jacobson, I. M. *et al.* Safety and Efficacy of Elbasvir/Grazoprevir in Patients With Hepatitis C Virus Infection and Compensated Cirrhosis: An Integrated Analysis. *Gastroenterology* **152**, 1372–1382.e2 (2017).
91. HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Welcome and Methods. (2018).
92. Grandal, M. *et al.* Prevalence of NS5A resistance associated substitutions in patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3: Impact on current therapeutic strategies. *J. Med. Virol.* **90**, (2018).
93. von Felden, J. *et al.* High efficacy of sofosbuvir/velpatasvir and impact of baseline resistance-associated substitutions in hepatitis C genotype 3 infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47**, 1288–1295 (2018).

94. Zeuzem, S. *et al.* Glecaprevir–Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *N. Engl. J. Med.* **378**, 354–369 (2018).
95. AASLD & IDSA. HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. *Hepatology* **62**, 932–954 (2015).
96. Apers, L. *et al.* Risk Factors for HCV Acquisition Among HIV-Positive MSM in Belgium. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **68**, 585–593 (2015).
97. Hagan, H., Jordan, A. E., Neurer, J. & Cleland, C. M. Incidence of sexually transmitted hepatitis C virus infection in HIV-positive men who have sex with men. *AIDS* **29**, 2335–2345 (2015).
98. Urbanus, A. T. *et al.* Trends in hepatitis C virus infections among MSM attending a sexually transmitted infection clinic; 1995-2010. *AIDS* **28**, 781–90 (2014).
99. Bollepalli, S. *et al.* A comparison of risk factors for HCV-mono-infection, HIV-mono-infection, and HCV/HIV-co-infection in a community setting. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 517–21 (2008).
100. Lea, T., Lee, E., Mao, L., de Wit, J. & Holt, M. HIV and hepatitis C virus co-infection among men who have sex with men in Sydney, and associations with sexual and drug use practices. *Sex. Health* **10**, 448–51 (2013).
101. Jacka, B. *et al.* Transmission of hepatitis C virus infection among younger and older people who inject drugs in Vancouver, Canada. *J. Hepatol.* **64**, 1247–1255 (2016).
102. Jacka, B. *et al.* Phylogenetic clustering of hepatitis C virus among people who inject drugs in Vancouver, Canada. *Hepatology* **60**, 1571–1580 (2014).
103. Gray, R. R. *et al.* The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. *BMC Evol. Biol.* **11**, 131 (2011).
104. Sarrazin, C. *et al.* Late Relapse Versus Hepatitis C Virus Reinfection in Patients With Sustained Virologic Response After Sofosbuvir-Based Therapies. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 44–52 (2017).

105. Paraschiv, S. *et al.* Epidemic dispersion of HIV and HCV in a population of co-infected Romanian injecting drug users. *PLoS One* **12**, e0185866 (2017).
106. Olmstead, A. D. *et al.* A molecular phylogenetics-based approach for identifying recent hepatitis C virus transmission events. *Infect. Genet. Evol.* **33**, 101–9 (2015).
107. Lemey, P. & Vandamme, A.-M. Exploring full-genome sequences for phylogenetic support of HIV-1 transmission events. *AIDS* **19**, 1551–2 (2005).
108. González-Candelas, F., López-Labrador, F. X. & Bracho, M. A. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* **3**, 2006–24 (2011).
109. Ceccherini Silberstein, F. *et al.* Hepatitis C virus gene sequencing as a tool for precise genotyping in the era of new direct antiviral agents. *Hepatology* **63**, 1058–9 (2016).
110. Schneider, M. D. & Sarrazin, C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: Do we need resistance testing? *Antiviral Res.* **105**, 64–71 (2014).
111. Abdelrahman, T. *et al.* Next-generation sequencing sheds light on the natural history of hepatitis C infection in patients who fail treatment. *Hepatology* **61**, 88–97 (2015).
112. Robaeys, G., Bielen, R., Azar, D. G., Razavi, H. & Nevens, F. Global genotype distribution of hepatitis C viral infection among people who inject drugs. *J. Hepatol.* **65**, 1094–1103 (2016).
113. Esteban, J. I., Sauleda, S. & Quer, J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* **48**, 148–162 (2008).

ANEXOS

ANEXO-II- CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Título del estudio: Caracterización Viroológica de los pacientes que no consiguen Respuesta Viral Sostenida a tratamiento con Antivirales de Acción Directa frente al Virus de la Hepatitis C libres de interferón.

Yo, (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Las muestras obtenidas en este estudio solo serán utilizadas para los fines específicos del mismo.

Fecha

Firma del paciente

Fecha

Firma del Investigador y DNI

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE (H.I.P.)

Estimado Sr.:

Mediante este documento pretendemos proporcionarle la información necesaria para que comprenda por qué le pedimos su consentimiento para participar en el estudio **“Caracterización Viroológica de los pacientes que no consiguen Respuesta Viral Sostenida a tratamiento con Antivirales de Acción Directa frente al Virus de la Hepatitis C libres de interferón”**.

El estudio pretende aportar información virológica sobre cómo se pueden volver a tratar los pacientes que, como usted, no han conseguido la curación de su hepatitis C, después de haberse tratado con los nuevos fármacos antivirales de acción directa.

Para ello, en la muestra que le han extraído para saber si usted sigue teniendo el virus en sangre (tubo de EDTA o suero de 5-7 ml), vamos a investigar si el virus que le infecta se ha hecho resistente a los fármacos que ha tomado, y de esa manera saber cuál es la mejor combinación que se le puede ofrecer para el retratamiento, y así disponer de mayores posibilidades de éxito para conseguir que usted se cure de su hepatitis C. La muestra que utilizaremos para este análisis no se va a utilizar para ningún otro propósito. Los datos relativos al virus que aislemos, y sus datos personales (edad, sexo, y otros datos de salud), se tratarán de acuerdo a la confidencialidad y seguridad que exige la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD, Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal), y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos en condiciones de seguridad. El acceso a dicha información quedará restringido al personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

ANEXO –III: VOLANTE DE PETICIÓN DE ESTUDIO DE RESISTENCIAS

HOSPITAL PETICIONARIO: FACULTATIVO PETICIONARIO: (e-mail de contacto):	FECHA:
--	---------------

DATOS DE FILIACIÓN DEL PACIENTE (etiqueta):

NOMBRE DEL PACIENTE:	NUHSA/Nº HC:
FECHA NACIMIENTO:	SEXO:

MOTIVO DE SOLICITUD:

Resistencias basales (Sin tratamiento previo con AAD)

Resistencias tras fallo a tratamiento.....
 (en este caso, marcar el régimen que proceda):

Sofosbuvir/Simeprevir		Ribavirina	
Sofosbuvir/Daclatasvir		Ribavirina	
Sofosbuvir/Ledipasvir		Ribavirina	
Paritaprevir/Ombitasvir±Dasabuvir		Ribavirina	
Sofosbuvir/Velpatasvir		Ribavirina	
Grazoprevir/Elbasvir		Ribavirina	
Otro (indicar cuál):			

ID. MUESTRA

DURACIÓN (semanas):

Fallo Intra-tratamiento (sem.):.....

Fallo Post-tratamiento (sem.):.....

TRATAMIENTOS PREVIOS:

MOMENTO DE LA TOMA DE MUESTRA: Basal Fallo (semana):

GENOTIPO EN ORIGEN:

MÉTODO COMERCIAL DE GENOTIPADO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE ORIGEN:

Innolipa Roche
 Abbott Real Time Otro (indicar cuál):

CARGA VIRAL DE LA MUESTRA Y FECHA:

Dirección de Envío: Hospital Campus de la Salud (PTS)
 Laboratorio de Microbiología Molecular (Servicio de Microbiología). Planta 1
 Av. Del Conocimiento s/n, 18016 – Granada

Enviar 2 ml de Plasma o Suero congelado, o un tubo de 10 ml de sangre-EDTA refrigerada, **sin congelar**, siempre que se asegure la recepción en el laboratorio en menos de 24 horas.
Se ruega cumplimentar una solicitud por muestra enviada.

