

PACIENTE CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN TRATAMIENTO EN LOS NUEVOS FÁRMACOS ANTIVIRALES.

CASO 643

Varón de 49 años, con antecedentes de politransfusión por episodios repetidos de hemorragia digestiva. En el control analítico habitual se detecta una elevación de: aspartato-aminotransferasa (GOT), 57 U/L; alanina-aminotransferasa (GPT), 88 U/L; gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), 84 U/L. Posteriormente se solicita serología de hepatitis y perfil hepático obteniéndose un resultado positivo para anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (VHC) y serología negativa para el virus de la hepatitis B y para el VIH.

El paciente presenta una carga viral de 2.089.584 UI/mL. La determinación del genotipo del virus C por el test comercial "VHC (LiPA) VERSANT® 2.0 (Siemens Healthcare Diagnostic)", no pudo discriminar a nivel de subtipo, obteniendo como resultado el genotipo 1.

Presenta fibrosis hepática grado 2.

Se decide solicitar tratamiento con antivirales directos. La eficacia del tratamiento varía entre los subtipos 1a y 1b, por ello para elegir el régimen terapéutico más adecuado y en ocasiones la duración del mismo es necesario conocer el subtipo viral. Tras un estudio mediante secuenciación se consiguió determinar el genotipo viral (1b). Tras el tratamiento antiviral aplicado el paciente evolucionó correctamente, alcanzando respuesta viral sostenida (RVS) y erradicación definitiva del VHC.

¿Qué influencia tiene el genotipo en los nuevos tratamientos?

El tratamiento clásico utilizado en la hepatitis C crónica, la combinación de interferón-pegilado y ribavirina, alcanzaba diferentes tasas de RVS en función del genotipo viral. En pacientes con genotipo 1 a/b, la eficacia de interferón-pegilado con ribavirina era del 40-50% en pacientes mono infectados por VHC.

Uno de los principales avances en el tratamiento de la infección por VHC son los agentes antivirales de acción directa (AAD), dirigidos frente a diferentes enzimas del VHC y con eficacia muy elevada, aumentando las tasas de RVS al 80-95%, dependiendo del genotipo viral, el grado de fibrosis hepática y la respuesta a tratamiento previos recibidos (respondedor nulo, respondedor parcial, recidiva viral tras fin del tratamiento, o bien, *naïve* al tratamiento de la hepatitis C). En la actualidad, estos parámetros (genotipo viral, grado de fibrosis hepática y respuesta previa al tratamiento) son los más importantes a la hora de seleccionar el tratamiento antiviral de nueva generación y la duración del mismo (12 ó 24 semanas). Desde el punto de vista del Servicio de Microbiología, la determinación del genotipo viral se ha convertido en una prueba clave en la práctica clínica para el éxito del tratamiento.

El Pleno del Consejo Interterritorial del SNS del Ministerio de Sanidad español aprobó un "Plan estratégico para el abordaje de la hepatitis C" con fecha 26 de marzo del 2015, donde se recogen algunas

recomendaciones generales y pautas para el tratamiento, especificando para cada genotipo y grado de fibrosis cuál sería el más adecuado (disponible en: <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2015/04/a77478e2a1147600cb9979b5992281cb.pdf>). Se puede encontrar información más actualizada en la guía realizada por “American Association for the Study of Liver Diseases” (AASLD) (disponible en: <http://www.hcvguidelines.org/full-report/initial-treatment-box-summary-recommendations-patients-who-a-re-initiating-therapy-hcv>). Según esta guía, en el caso de pacientes *naïve* con infección por el genotipo 1 se recomiendan regímenes con potentes AAD, pero existen diferencias en base al subtipo: el genotipo 1a tiende a presentar mayor tasa de recaída en comparación con el genotipo 1b con ciertos regímenes. A continuación se detalla algunas recomendaciones para el tratamiento de pacientes *naïve* infectados con el genotipo 1b:

	TRATAMIENTO	DURACIÓN
1	DACLATASVIR + SOFOSBUVIR	SIN CIRROSIS: 12 SEMANAS
		CIRROSIS: 24 SEMANAS (CON O SIN RIBAVIRINA)
2	LEDIPASVIR/SOFOSBUVIR	12 SEMANAS
3	PARITAPREVIR/RITONAVIR/OMBITAS - VIR + DASABUVIR (*)	12 SEMANAS
4	SIMEPREVIR + SOFOSBUVIR (**)	SIN CIRROSIS: 12 SEMANAS
		CIRROSIS: 24 SEMANAS (CON O SIN RIBAVIRINA)

(*) En genotipo 1a, se añade ribavirina. En caso de no presentar cirrosis el tratamiento es de 12 semanas y en caso contrario 24 semanas.

(**) En el caso de genotipo 1a, confirmar ausencia de polimorfismo Q80K en la región NS3 del virus.

¿Cómo se estudia el genotipo del virus de la hepatitis C?

Para determinar el genotipo del VHC se han descrito una amplia variedad de procedimientos moleculares, ensayos que se basan generalmente en analizar la secuencia de un segmento del genoma amplificado por PCR.

Se disponen de varios métodos comerciales basados en:

Hibridación inversa con sondas de oligonucleótidos inmovilizados en una tira de nitrocelulosa. Las dos casas comerciales más utilizadas en nuestros hospitales son VHC (LiPA) VERSANT® 2.0 (Siemens Healthcare Diagnostic) y Linear array HCV Genotyping Test (Roche Molecular Systems); ambas analizan dos fragmentos de las regiones 5'UTR y core.

PCR a tiempo real de la región 5'UTR y NS5B, Abbott Real-time™ HCV Genotype II assay (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA).

Secuenciación de la región 5' no codificante (Trugene 5'NC HCV Genotyping Kit, Siemens).

Todas las técnicas son capaces de diferenciar correctamente a nivel de genotipo, pero su capacidad de discriminar entre subtipos 1a y 1b es limitada. No han sido diseñadas para identificar infecciones mixtas.

En los casos en los que no se pueda determinar el subtipo por estos métodos se puede realizar una secuenciación de la región NS5B, ya sea tipo Sanger o por secuenciación masiva.

Clasificación genotípica del VHC.

El VHC presenta una elevada heterogeneidad clasificándose en genotipos, cuyas secuencias de nucleótidos difieren entre sí en un 30-35% y en subtipos cuando la diferencia es <15% (1). Durante años se han reconocido 6 genotipos principales, pero en un estudio reciente se han confirmado 7 genotipos y 67 subtipos.

Los subtipos más comunes incluyen 1a, 1b y 1c en el genotipo 1; 2a, 2b y 2c en el genotipo 2; 3a, 3b y 3k en el genotipo 3; 4a en el genotipo 4; 5a en el genotipo 5, y 6a, 6b y 6d en el genotipo 6.

En cuanto a la distribución mundial del VHC destaca el genotipo 1 (subtipos 1a y 1b) como el más prevalente en el mundo. En concreto en España la población infectada por VHC muestra un predominio del genotipo 1, en particular el 1b.

Utilidad de la secuenciación masiva en el genotipo del VHC.

El método de referencia para determinar tanto el genotipo como el subtipo es la secuenciación directa del genoma completo del virus y el posterior análisis filogenético, pero se considera que la secuenciación de la región polimórfica de NS5B permite obtener la misma información. Para ello se puede llevar a cabo la secuenciación clásica de Sanger o secuenciación masiva.

En un estudio realizado recientemente por el grupo de investigación liderado por J. Quer et al, del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona (cita 2), se compararon dos técnicas comerciales (Versant HCV Genotype 2.0 y Abbott real-time HCV genotype II) frente a la secuenciación de la región NS5B; en el 16% de las muestras los ensayos comerciales llegaron a identificar el genotipo 1 pero no proporcionaron el subtipo y en más de la mitad de las muestras que no eran del genotipo 1 fueron incapaces de identificar el genotipo y/o subtipo del VHC. La secuenciación de la región NS5B del VHC proporciona una identificación precisa a nivel de genotipo y subtipo en la mayoría de los casos, pero no se puede descartar la existencia de recombinantes inter-genotípicas, lo que requeriría la secuenciación del genoma completo para su análisis.

Las técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación consisten en fragmentar el genoma en secuencias relativamente pequeñas, amplificar y secuenciar todos estos fragmentos en paralelo, de forma masiva, con un ensamblaje posterior por métodos bioinformáticos. La aplicación de la

secuenciación masiva en la determinación del genotipo permite clasificar de forma más precisa el genotipo y subtipo ya que en ocasiones los pacientes presentan infección por diferentes cepas virales (diferente genotipo, subtipo o cuasiespecies); por tanto, el análisis de la composición de la población viral intra-huésped requiere la secuenciación de tantas variantes como sea posible.

Se han propuesto alternativas a la secuenciación del genoma viral, como la espectrometría de masas para caracterizar el VHC intra-huésped, basadas en identificar secuencias de nucleótidos y evaluación de su diversidad, pero estos métodos de “no-secuenciación” están poco desarrollados y con ellos no se obtiene la estructura de la población viral.

Por tanto, los métodos más potentes para analizar la composición de la población del VHC intra-huésped son las técnicas de secuenciación de masiva que permiten:

Identificar coinfecciones con diferentes genotipos o subtipos del VHC.

Cobertura suficiente para detectar variantes con frecuencia <0,1%.

Identificar la variabilidad del virus.

Aportar información acerca de posibles mutaciones que impliquen la aparición de resistencias a los tratamientos.

Hay diferentes abordajes metodológicos; actualmente los sistemas 454 (Roche) e Illumina son los más desarrollados, pero es un campo en continua expansión que probablemente se convierta en una herramienta clave en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Por tanto, la determinación del genotipo viral es un aspecto clave a la hora de establecer el tratamiento correcto en los pacientes con hepatitis C crónica. La secuenciación masiva del genoma viral es la técnica más segura y eficaz para determinar el genotipo, los subtipos y otras subpoblaciones virales. Estas técnicas ayudarán a lograr la curación de esta enfermedad en la gran mayoría de los pacientes y avanzar hacia la erradicación de la hepatitis C.

Bibliografía

Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59: 318-27.

Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frias F, et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 219-26.

Caso descrito y discutido por:

M^a Carmen Bernal¹, Adelina Gimeno¹, Esperanza Merino², Joaquín Portilla^{2,3} y Juan Carlos Rodríguez^{1,3}

¹Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Alicante

²Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario de Alicante

³Universidad Miguel Hernández. Elche. Alicante

Correo electrónico: rodriguez_juadia@gva.es

Palabras Clave: *Hepatitis C, Virus de la hepatitis C,*