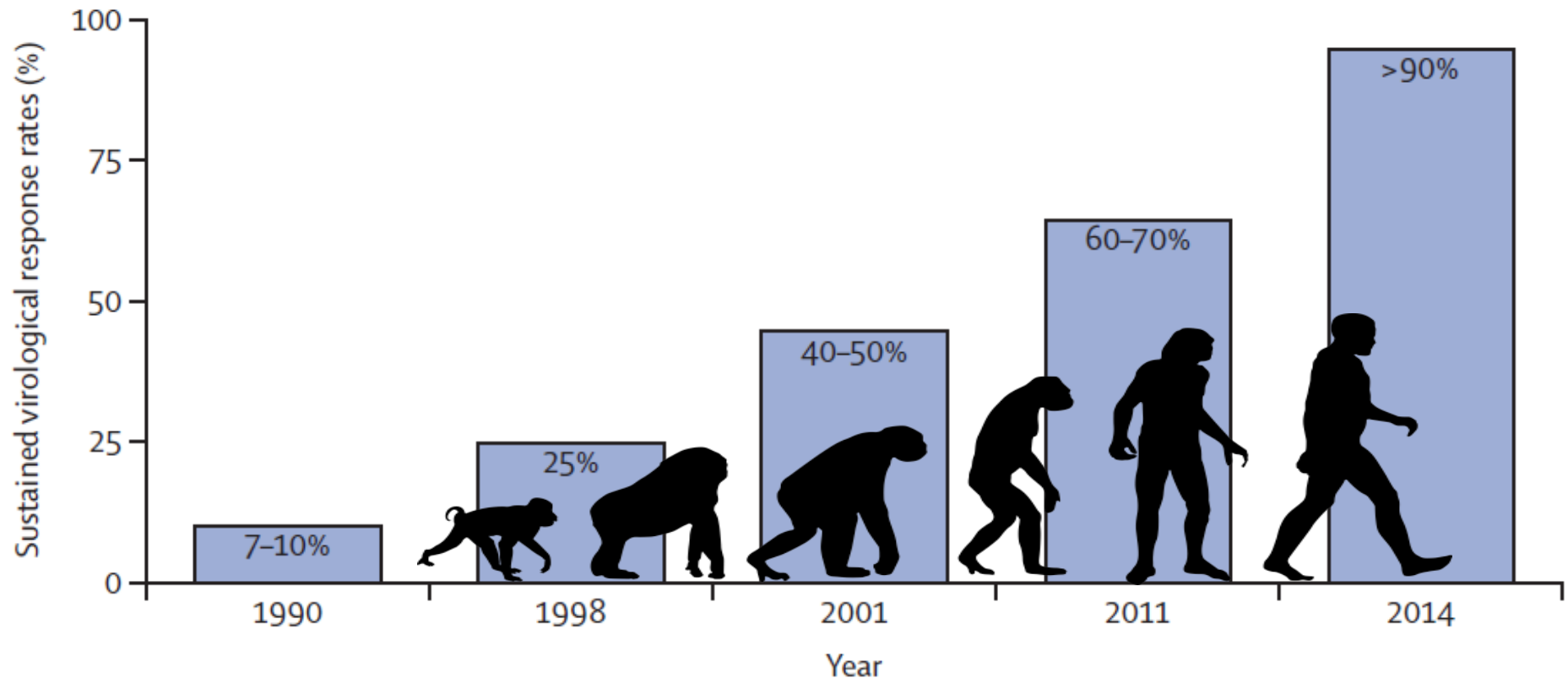
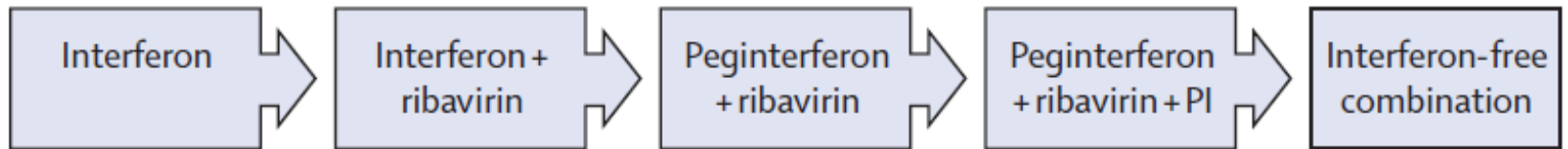


Avances en el diagnóstico de la Hepatitis C.

Alfredo Pérez Rivilla
Hospital Universitario 12 de Octubre

Los tratamientos evolucionan...



...y el diagnóstico y monitorización de los Ttos?

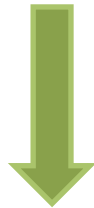
Nuevos fármacos cambian los regímenes de tratamientos



***Simplificación del
seguimiento:
CVs ?***



***Pruebas de
genotipado***



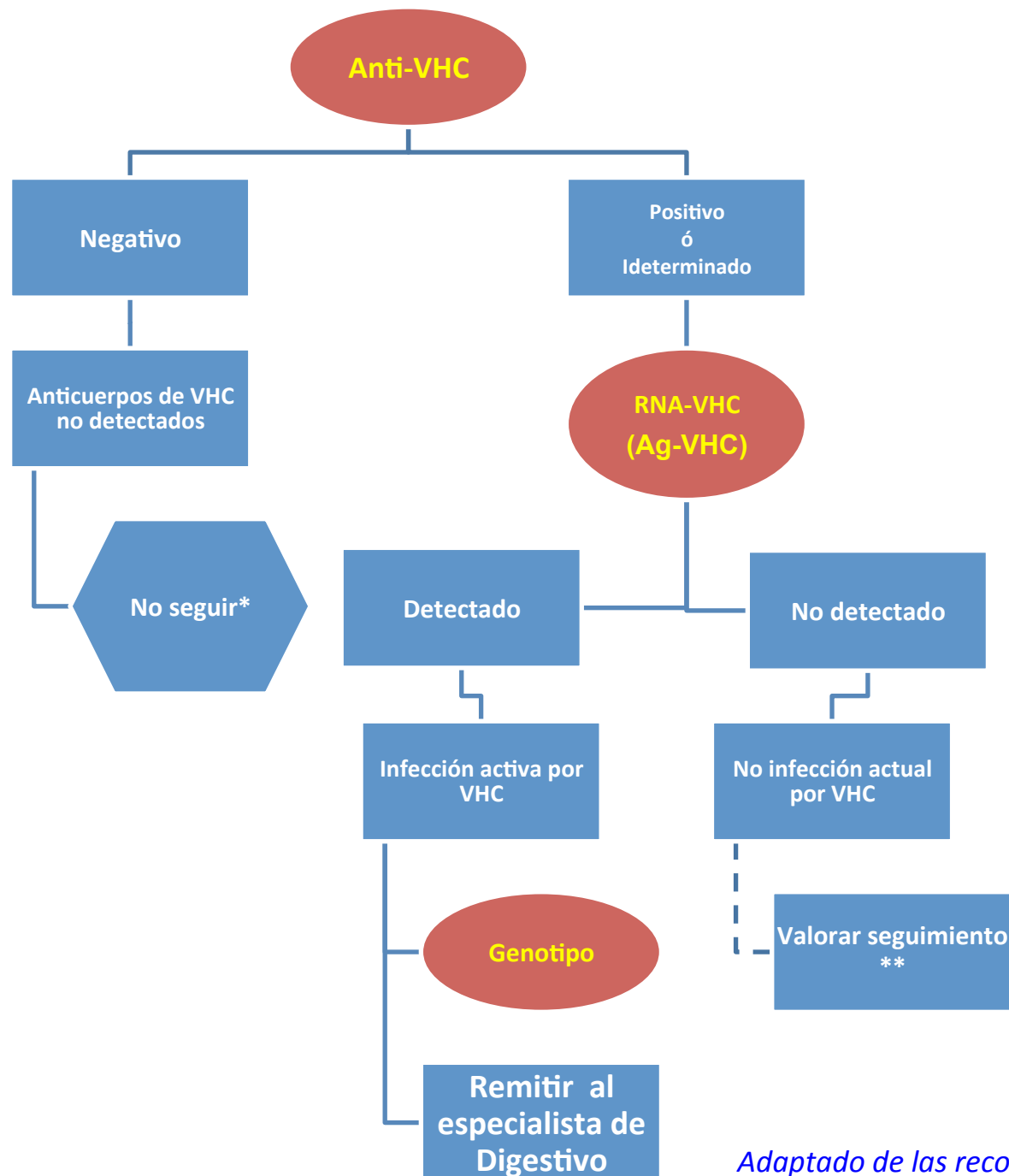
***¿Son adecuadas
las pruebas
comerciales?***



***Las mutaciones
asociadas a
resistencia cambian***



***¿Es un problema la
resistencia a los
nuevos AAD?***



Algoritmo diagnóstico.

** Valorar determinar RNA-VHC en personas con infección aguda (sensibilidad de anti-VHC es del 50-70%), si existe sospecha de exposición al virus en meses previos o en inmunodeprimidos.*

*** Para diferenciar infección pasada de un falso positivo de anti-VHC, realizar otra prueba diferente de anti-VHC (con otros antígenos), en el caso de falsas reactividades esta segunda prueba será negativa. Valorar repetir RNA-VHC en aquellos casos con historia de exposición en meses previos o con evidencia de hepatopatía no explicable por otras causas.*

Anti-VHC, test de primera línea diagnóstica

Si se detectan anti-VHC, debe determinarse ARN-VHC con prueba molecular sensible

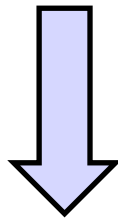
Ante la sospecha de infección aguda o en pacientes inmunodeprimidos, el ARN-VHC debe ser parte de la evaluación inicial.

En individuos anti-VHC positivos y ARN-VHC negativos, debe repetirse ARN-VHC tres meses más tarde para confirmar el resultado.

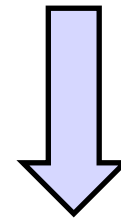
(A1)

Objetivo y variable principal de valoración del Tto de la hepatitis C

The endpoint of therapy is undetectable HCV RNA in a sensitive assay (≤ 15 IU/ml) 12 weeks (SVR12) and 24 weeks (SVR24) after the end of treatment (**A1**)



Evaluación previa al Tto



Monitorización del Tto.

Evaluación previa al tratamiento

Detección/cuantificación del ARN-VHC

Determinación del genotipo VHC

Detección/cuantificación de ARN-VHC con un ensayo sensible, con umbral de detección ≤ 15 UI/ml (A1)

Determinar genotipo de VHC y el subtipo (1a/1b) en genotipos 1 (A1)

No indicada la determinación de *IL28B* con los nuevos AAD (A1)

No indicadas las pruebas de resistencia (excepto en pacientes con genotipo 1a que van a recibir terapia combinada con simeprevir) (A1)

Principales ensayos comerciales utilizados en la cuantificación del ARN-VHC

FABRICANTE	ENSAYO	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN (UI/ML)
Roche Diagnostics	COBAS Ampliprep /COBAS TaqMan HCV	PCR tiempo real	15
Siemens Medical Solutions Diagnostics	VERSANT HCV RNA 1.0 Assay (kPCR)	PCR tiempo real	15
Abbott Molecular	Abbott RealTime HBV	PCR tiempo real	12
QIAGEN Diagnostics	artus HBV QS-RGD Kit	PCR tiempo real	21

Distribución de las técnicas utilizadas por los participantes (n: 92) en el CC de SEIMC 2014

	PCR-RT Taqman (Roche)	PCR-RT (Abbott)	PCR-RT (Qiagen Diagnostics)	b-DNA (Siemens)	PCR-RT (In house)
Número	74	12	3	2	1
Porcentaje	80,4	13,0	3,3	2,2	1,1

500 μ L: 15 IU/mL a 1×10^8 IU/mL
200 μ L: 40 IU/mL a 1×10^8 IU/mL



Mismo fundamento metodológico que
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Quantitative Test, v2.0

Sistema cobas® 6800



Diseño del ensayo de doble sonda



Veris MDx hepatitis C virus (HCV) assay (Beckman)



Real-time TMA (amplificación
mediada por transcripción)

Región diana: 5'-UTR

Limite de Detección (LoD) :

4.3 IU/ml (Plasma)

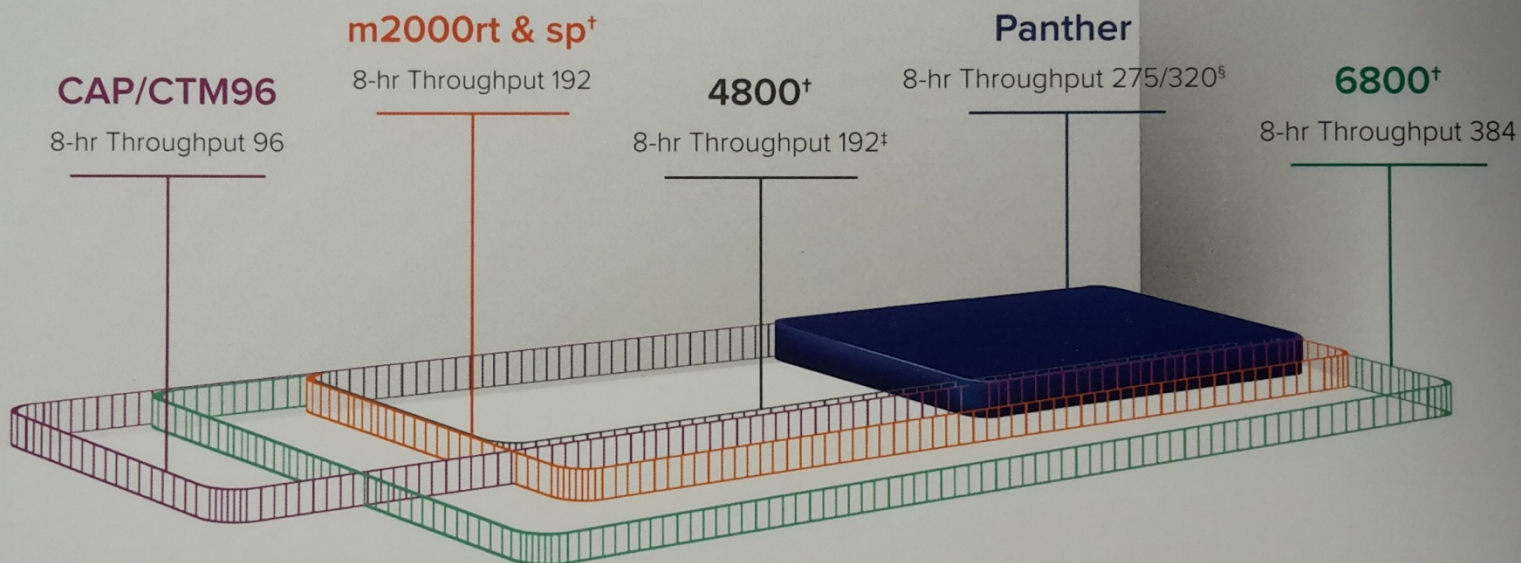
3.9 IU/ml (Serum)

Panther , Aptima HCV Quant Dx (Hologic)

- **Automatización total**
- **Tiempos de respuesta más rápidos**
- **Menú ampliado de ensayos**
- **Mayor rendimiento muestras (más muestras y varios ensayos a la vez)**
- **Simplifican la gestión de peticiones y resultados (conexión bidireccional al SIL)**

....poco que objetar

El tamaño, importa...



[†]Dimensions include instrument and other required data stations, computers, and/or servers.²

[†]Throughput calculated based on CT/NG.

[§]See product specifications for throughput details.

Evaluación previa al tratamiento

Detección/cuantificación
del ARN-VHC

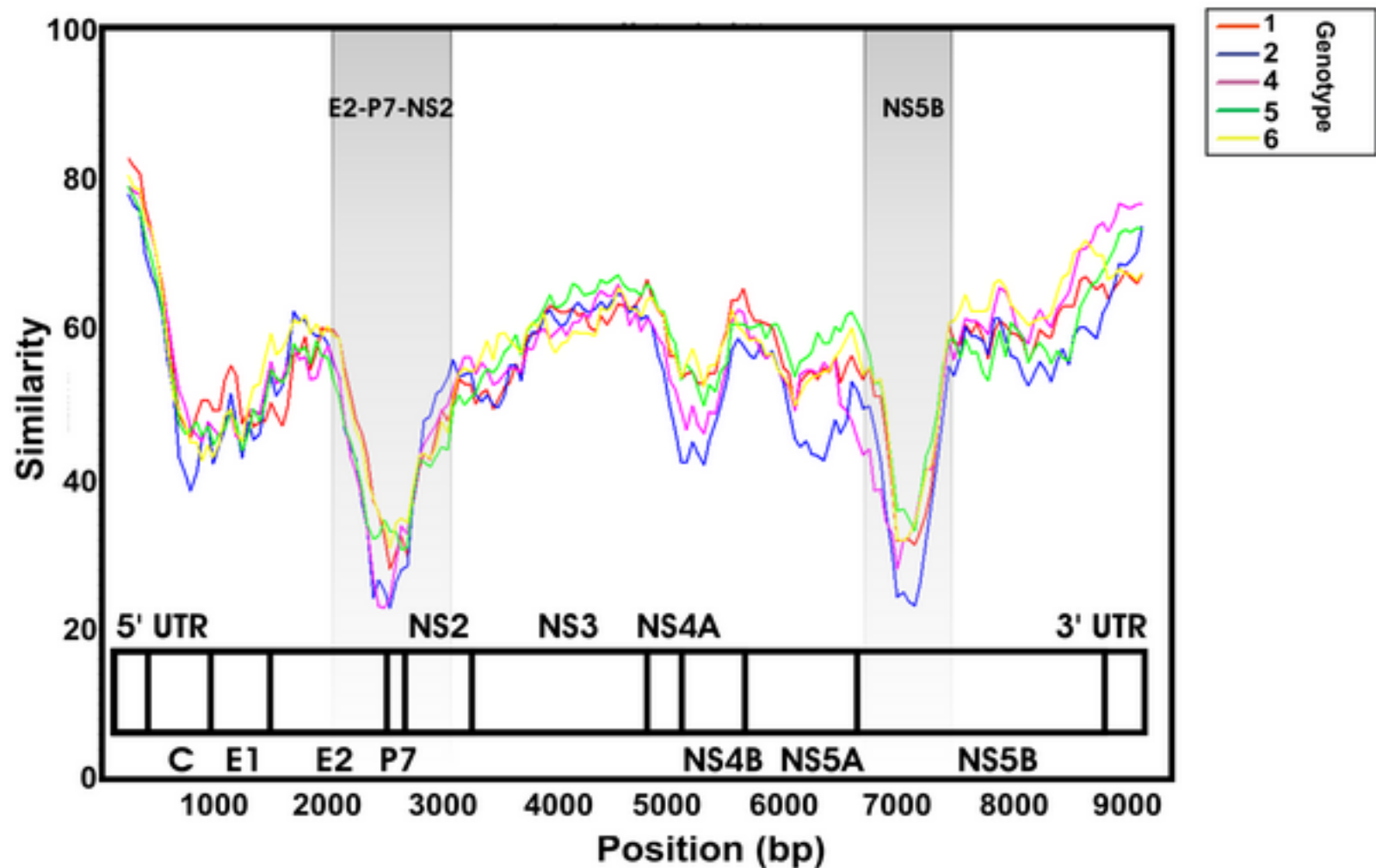
Determinación del
genotipo VHC

The HCV **genotype and genotype 1 subtype (1a/1b)** must be assessed prior to treatment initiation and will determine the choice of therapy **(A1)**

Pruebas de caracterización molecular (genotipado) del VHC

La duración del tratamiento, las tasas de curación y la necesidad de añadir ribavirina o INF a los nuevos AAD, en parte es dependiente del genotipo o subtipo infectante.

Para la determinación del genotipo se pueden examinar diferentes regiones del genoma



SPECIAL ARTICLE

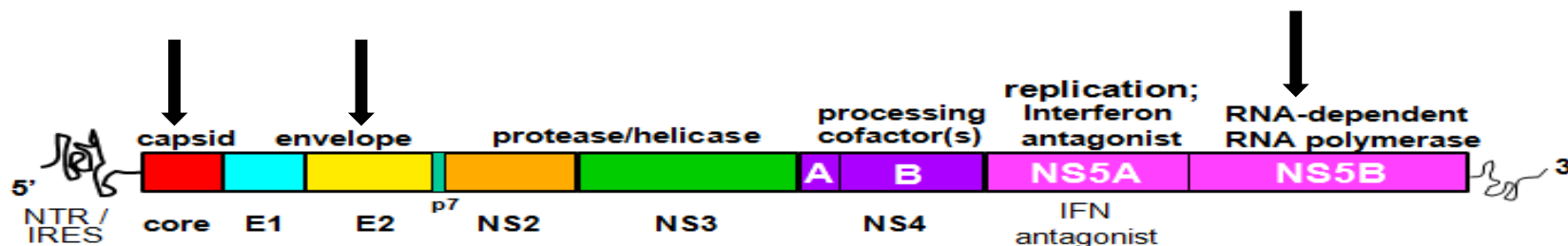
Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource

Donald B. Smith,¹ Jens Bukh,² Carla Kuiken,³ A. Scott Muerhoff,⁴ Charles M. Rice,⁵
Jack T. Stapleton,⁶ and Peter Simmonds¹

VHC es clasificado en base a la secuencia del genoma completo:

- **7 genotipos**, sus secuencias difieren 30-35%
- **67 subtipos** confirmados y 20 provisionales (Core/E2 y NS5B)

Las variantes de un mismo subtipo difieren <15%



Distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the period 2011-2015 (GEHEP 005 Study)

Estudio retrospectivo multicéntrico (24 hospitales de 9 CA)

Pacientes y método:

15.140 pacientes

Ensayos: LiPA 2.0 Siemens (42,9%)

Linear array HCV Roche (20,1%)

RT-PCR Abbott (18%)

Distribución de genotipos:	Hospital 12 de Octubre	
	2014 (n:301)	2015 (n:277)
Gen 1: 68,8%	68,7%	72,2%
1a 27%	30,2%	25,9%
1b 35,9%	38,5%	40,4%
Gen 2: 2,7%	1,6%	2,2%
Gen 3: 16,5%	17,9%	12,6%
Gen 4: 11,9%	10,6%	9,4%
Gen 5 y 6: 0,1%	-	1,5%

Distribución de las técnicas de genotipado utilizadas por los participantes (n: 74) en el CC de SEIMC 2014

	INNO-LiPA HCV (Siemens)	Linear array HCV (Roche)	RT HCV Abbott	Trugene (Siemens)	Desarrollo propio	Indefinido
Método	H. inversa	H. inversa	RT-PCR	Sec. 5'NC	Secuen.	-
Nº centros	47 (63,5)	4 (5,4%)	10 (13,5%)	3 (4,1%)	7 (9,5%)	3 (4,1%)

El método que se utilizó de forma mayoritaria por los participantes fue la hibridación inversa (68,9%), seguido de la RT-PCR y la secuenciación (13,5%).

Diferencias cualitativas de las pruebas de caracterización molecular (genotipado) del VHC

- **1ª Generación**

- TRUGENE® 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics/Siemens)
- INNO-LiPA® HCV I/II (Innogenetics)/VERSANT HCV Genotype Assay 1.0 (Siemens)
- LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test (Roche)

- Métodos basados en el **análisis de la región 5'UTR**
- Competentes para la determinación de los genotipos
- No útiles para dilucidar el subtipo

Diferencias cualitativas de las pruebas de caracterización molecular (genotipado) del VHC

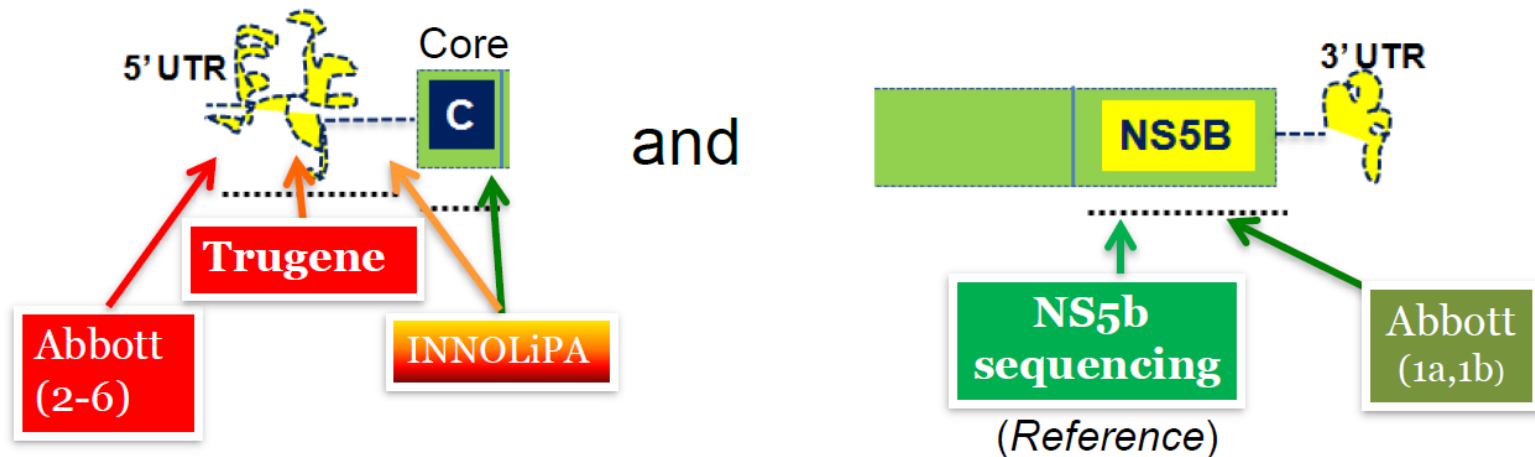
- **2ª generación**

Ensayo	Región analizada
GEN-ETI-K DEIA kit (DiaSorin) RT-PCR + Hibridación inversa	Core
VERSANT HCV genotype 2.0 (Bayer/Siemens) RT-PCR + Hibridación inversa	5'UTR y Core
TRUGENE NS5B HCV Genotyping Assay (Siemens) RT-PCR + Secuenciación	NS5B
Real Time HCV Genotyping II Test (Abbott) RT-PCR a tiempo real	5'UTR y NS5B

- **Mejoran la discriminación entre subtipos.**
- **Limitada capacidad para detectar infecciones mixtas**

Estudio GEHEP-007

- Evalúan 3 ensayos comerciales de genotipado
 - Trugene HCV genotyping kit (Siemens)
 - Versant HCV genotype 2.0 assay (Siemens)
 - Real Time HCV genotype II (Abbott)
- Método de referencia: secuenciación NS5B



Estudio GEHEP-007

- Trugene HCV, no asignó correctamente el genotipo en más de un tercio de los casos (15% de errores con impacto clínico)
- Versant LIPA HCV, resultados discordantes con impacto clínico en 11% de muestras.
- Abbott Real time HCV, no fue capaz de discriminar subtipos en genotipos 2, 3, 4 y 5.

High-Resolution Hepatitis C Virus Subtyping Using NS5B Deep Sequencing and Phylogeny, an Alternative to Current Methods

Josep Quer,^{a,b,c} Josep Gregori,^{a,b,d} Francisco Rodríguez-Frias,^{b,c,e} Maria Buti,^{a,b,c} Antonio Madejon,^{b,f} Sofia Perez-del-Pulgar,^{b,g} Damir Garcia-Cehic,^{a,b} Rosario Casillas,^{b,e} Maria Blasi,^{b,e} Maria Homs,^{b,e} David Tabernero,^{b,e} Miguel Alvarez-Tejado,^d Jose Manuel Muñoz,^d Maria Cubero,^{a,b,*} Andrea Caballero,^e Jose Antonio delCampo,^{b,h} Esteban Domingo,^{b,i} Irene Belmonte,^e Leonardo Nieto,^e Sabela Lens,^{b,g} Paloma Muñoz-de-Rueda,^{b,j} Paloma Sanz-Cameno,^{b,k} Silvia Sauleda,^{b,i} Marta Bes,^{b,i} Jordi Gomez,^{b,m} Carlos Briones,^{b,n} Celia Perales,^{b,i} Julie Sheldon,^{b,i} Lluís Castells,^{a,b,c} Lluís Viladomiu,^{a,b} Javier Salmeron,^{b,j} Angela Ruiz-Extremera,^{b,j} Rosa Quiles-Pérez,^{b,j} Ricardo Moreno-Otero,^{b,k} Rosario López-Rodríguez,^{b,k} Helena Allende,^o Manuel Romero-Gómez,^{b,h} Jaume Guardia,^{a,b,c} Rafael Esteban,^{a,b,c} Javier Garcia-Samaniego,^{b,f} Xavier Forns,^{b,g} Juan Ignacio Esteban^{a,b,c}

Se comparan: ensayo de SNG 454/GS-Junior, Versant HCV 2.0, Abbott RT HCV Genotype II y secuenciación NS5B (referencia).

..."We concluded that deep sequencing is **more efficient for HCV subtyping** than currently available methods and allows qualitative **identification of mixed infections** and may be more helpful with respect to informing treatment strategies with new DAA-containing regimens across all HCV subtypes ".

IDENTIFICATION OF HCV GENOTYPE 3 BY A COMMERCIAL ASSAY CHALLENGED BY NATURAL POLYMORPHISMS IN ISOLATES CIRCULATING IN SPAIN

E. Martró^{1,2}, V. Saludes^{1,2}, J. Quer^{3,4,5}, J. Gregori^{3,4,6}, E. Bascuñana¹, D. García-Cehic^{3,4}, J.I. Esteban^{3,4,5}, V. Ausina^{1,5,7}

¹Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP), Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain;

²CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; ³Liver Unit, Internal Medicine, Lab. Malalties Hepàtiques, Vall d'Hebron

Institute of Research (VHIR-HUVH), Barcelona, Spain; ⁴CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), ISCIII, Madrid, Spain; ⁵Universitat Autònoma de Barcelona,

Barcelona, Spain; ⁶Roche Diagnostics SL, Sant Cugat del Vallès, Spain; ⁷CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), ISCIII, Madrid, Spain.

*E-mail: emartro.igtp.germanstrias@gencat.cat, Tel: 934978894

BACKGROUND AND AIM

- Hepatitis C virus (HCV) genotyping is required in clinical practice in order to determine the type and duration of antiviral therapy. Indeterminate results must be resolved by alternative commercialized or in-house methods.
- Using a commercial genotyping assay (Real-Time HCV Genotype II, Abbott) an indeterminate genotype result has been obtained for 26 out of 1338 patients (1.94%) from 2009 to 2014 at HUGTIP.
- The reference genotyping method, based on Sanger sequencing and phylogenetic analysis of the NS5B region, classified 24 indeterminate cases as genotype 3 (HCV-3), representing 7.95% of all HCV-3 cases (N=302) (Figure 1).
- HCV-3 is the second most prevalent genotype worldwide (30%) and in Spain (19.6%). Additionally, it has been associated with a higher risk for liver disease progression, and has shown lower response rates to the newest antivirals.

Aim: To characterize the genetic diversity of the HCV 5' untranslated region (5'UTR), target of genotyping assays, by ultradeep pyrosequencing (UDPS) in the 24 indeterminate cases.

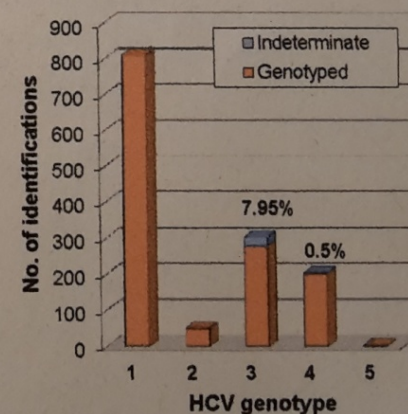


Figure 1. Genotyping results obtained with the commercial genotyping assay.

Utilizando **Real-Time HCV Genotype II** (Abbott), n: 1338

- 26 (1.94%) resultados indeterminados
- 24 indeterminados resultaron ser genotipos 3 (secuen. NS5B)

Los ensayos de genotipado comerciales

- En los ensayos de hibridación inversa así como los de secuenciación de 5'UTR, *la discriminación de subtipos del G1 es limitada.*

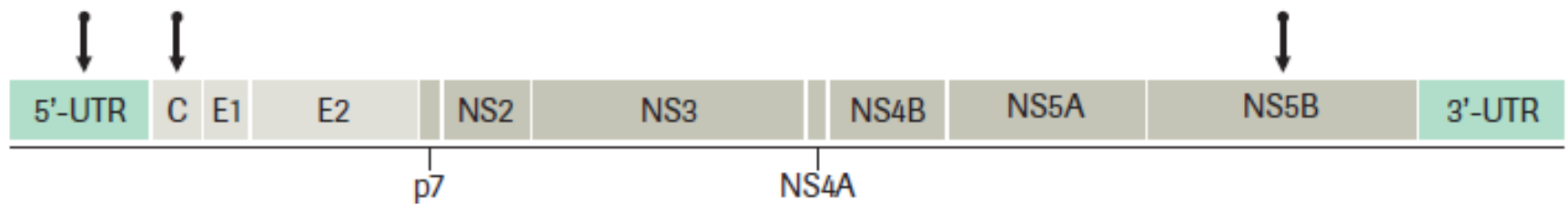
Relevancia clínica en Tto con AAD en Gen 1

- Todos los ensayos (incluida secuenciación 1ª G), presentan escasa sensibilidad para detectar infecciones mixtas.
- Todos, presentan resultados indeterminados en 2-5% de casos.



cobas® HCV GT
*HCV genotyping test for
 use on the **cobas®** 4800 System*

HCV genome organization and targets of cobas® HCV GT

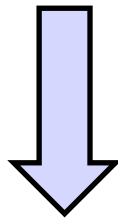


Ensayo de **PCR tiempo real**

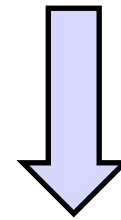
Regiones diana analizadas: **5'UTR, Core y NS5B**

Objetivo y variable principal de valoración del Tto de la hepatitis C

The endpoint of therapy is undetectable HCV RNA in a sensitive assay (≤ 15 IU/ml) 12 weeks (SVR12) and 24 weeks (SVR24) after the end of treatment **(A1)**



Evaluación previa al Tto



Monitorización del Tto.

Monitorización del tratamiento

Repetidas determinaciones de niveles de ARN-VHC durante (4 y 12 sem) y después del tratamiento (12 y 24 sem)



Evaluar la respuesta al tto.



Evaluar adhesión al tto.



Determinar retirada y/o duración del tto.

¿Los criterios utilizados en la monitorización de los tratamientos con INF, son útiles para guiar y predecir la respuesta del tratamiento con los nuevos AAD?

Utility of Hepatitis C Viral Load Monitoring on Direct-Acting Antiviral Therapy

Sreetha Sidharthan,¹ Anita Kohli,¹ Zayani Sims,¹ Amy Nelson,^{2,3} Anu Osinusi,^{3,4} Henry Masur,¹ and Shyam Kottlil^{2,3}

¹Critical Care Medicine Department, National Institutes of Health Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, ²Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, ³Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; and ⁴Gilead Sciences Inc, Foster City, California

Background. Hepatitis C virus (HCV) RNA loads serve as predictors of treatment response during interferon-based therapy. We evaluated the predictive ability of HCV RNA levels at end of treatment (EOT) for sustained virologic response (SVR₁₂) during interferon-sparing direct-acting antiviral therapies.

Conclusions. Contrary to past experience with interferon-containing treatments, low levels of quantifiable HCV RNA detected at the end of short-duration DAA therapy, and even after therapy, do not signify treatment failure.

Reglas de retirada del tratamiento

Únicamente contempladas para el tto combinado con INFpeg+RIB+SIM:

Retirar el tto, si ARN-VHC $\geq$ 25 UI/ml en la semana 4, 12 o 24 (A2)

Deberá cambiarse por otro régimen de tto con IFN + AAD u otra terapia libre de INF; en ambos casos deben excluirse los IPs. (B1)

No se han definido reglas de retirada para otras terapias con AAD. (A1)

La Respuesta Viral Sostenida (SVR), en la 12 o 24 sem postto, se corresponde con la cura definitiva de la infección por VHC en más del 99% de los casos

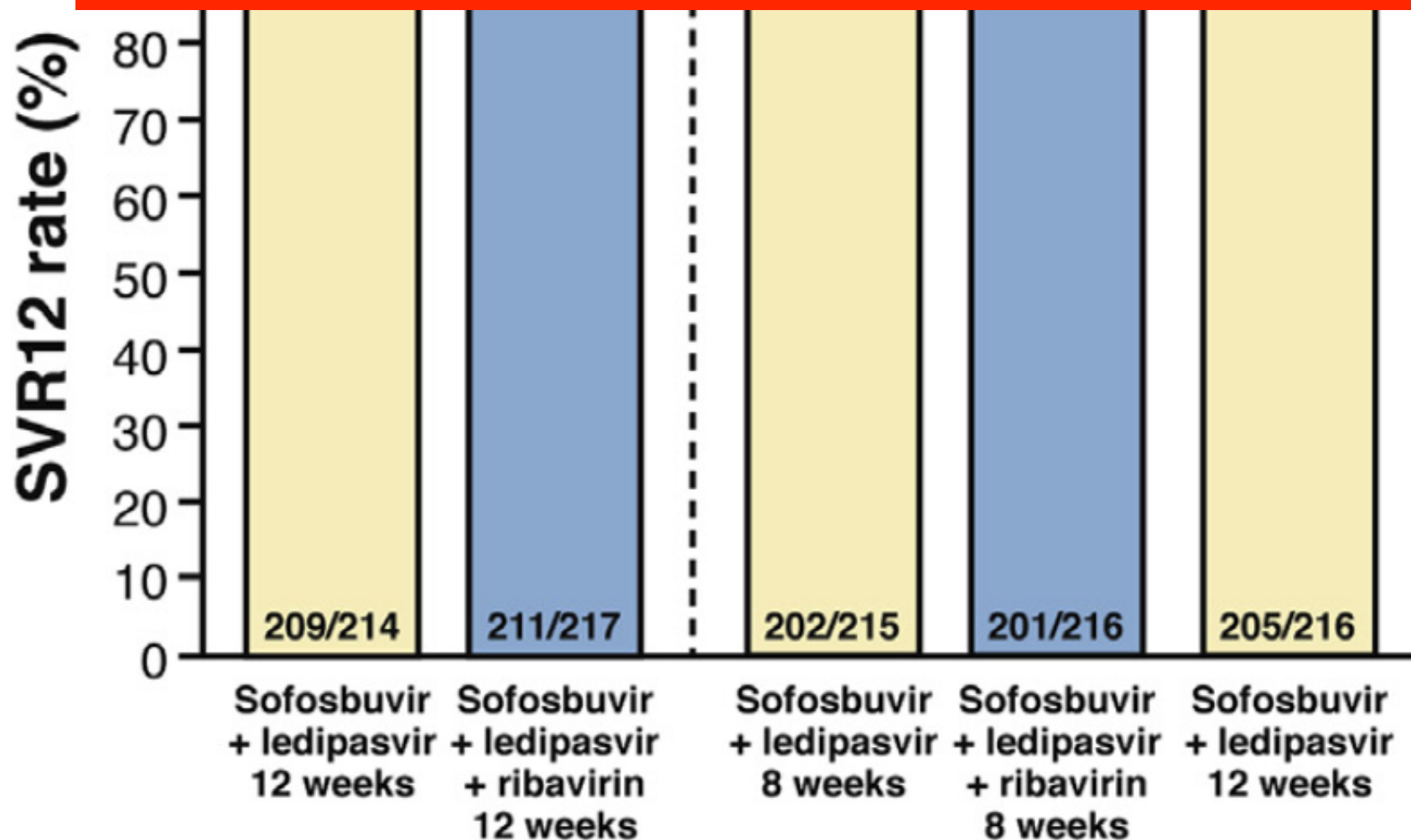
Monitoring for HCV during chemotherapy and immunosuppression.

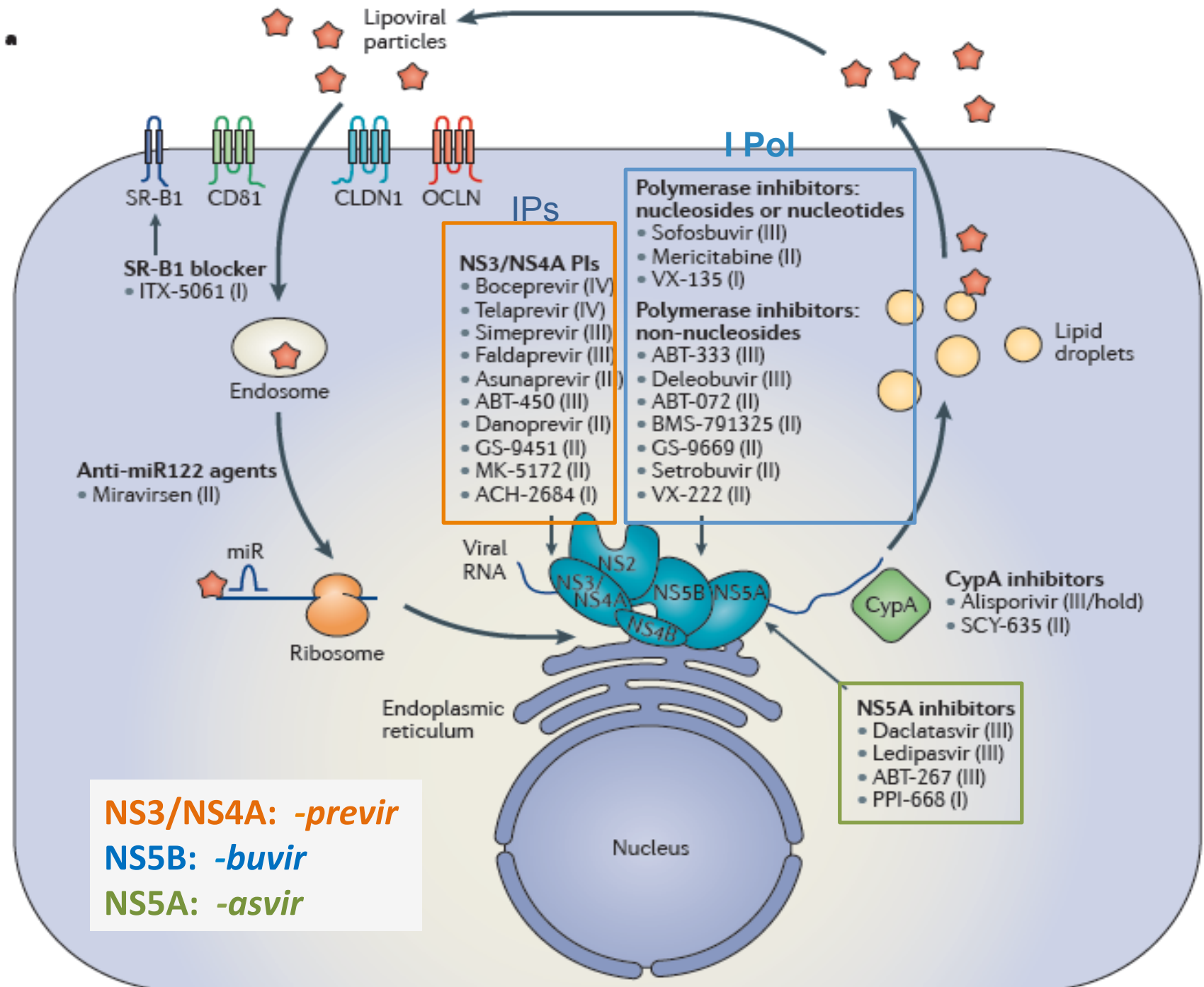
Prospective monitoring for HCV recurrence among patients who achieved a sustained virologic response and who are receiving immunosuppressive treatment (eg, systemic corticosteroids, antimetabolites, chemotherapy, etc) is NOT routinely recommended.

Rating: Class III, Level C

Resistencias a antivirales de VHC

El 5 – 15% no consiguen RVS

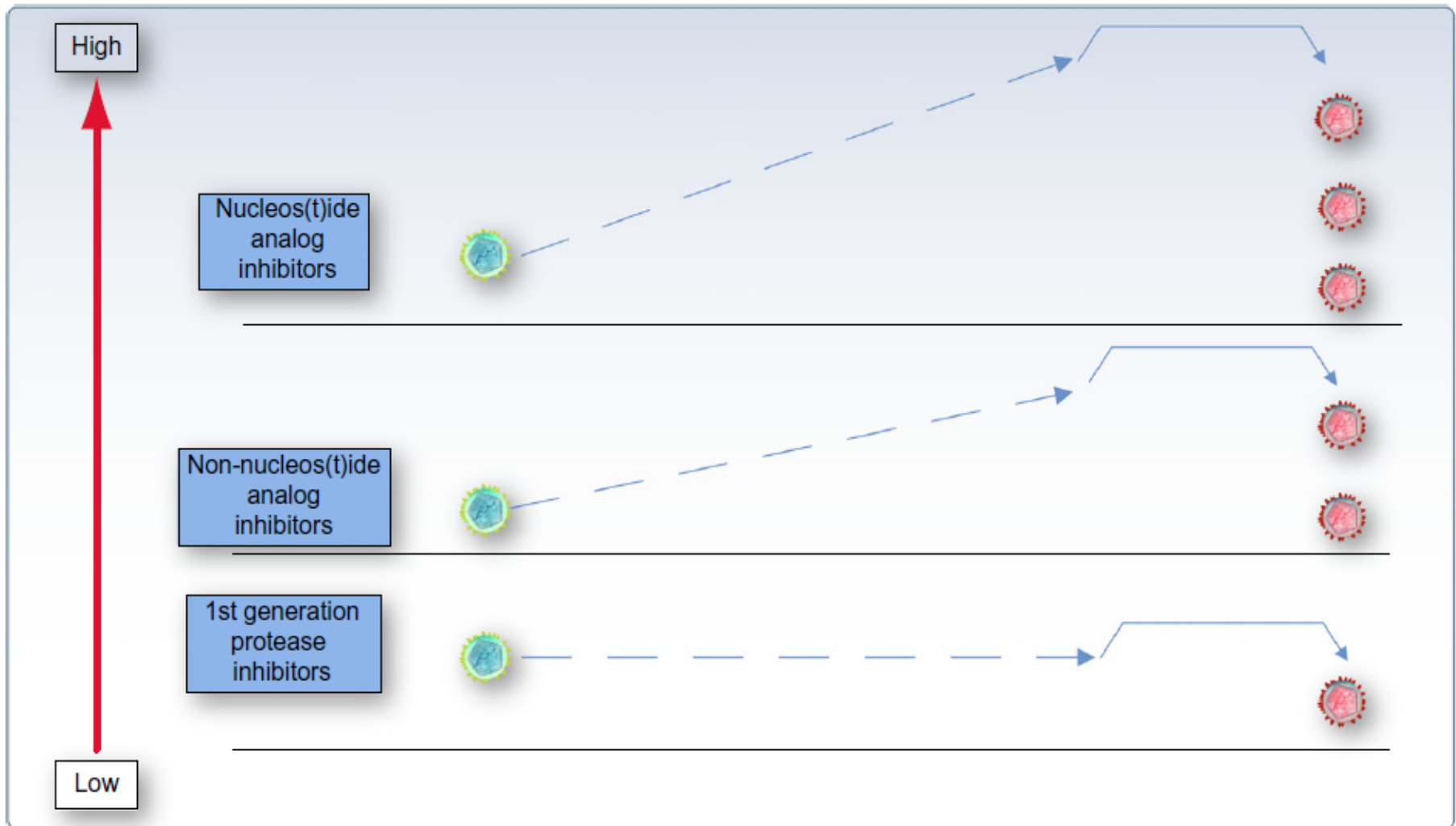




Factores que influyen en la resistencia del VHC a los AAD

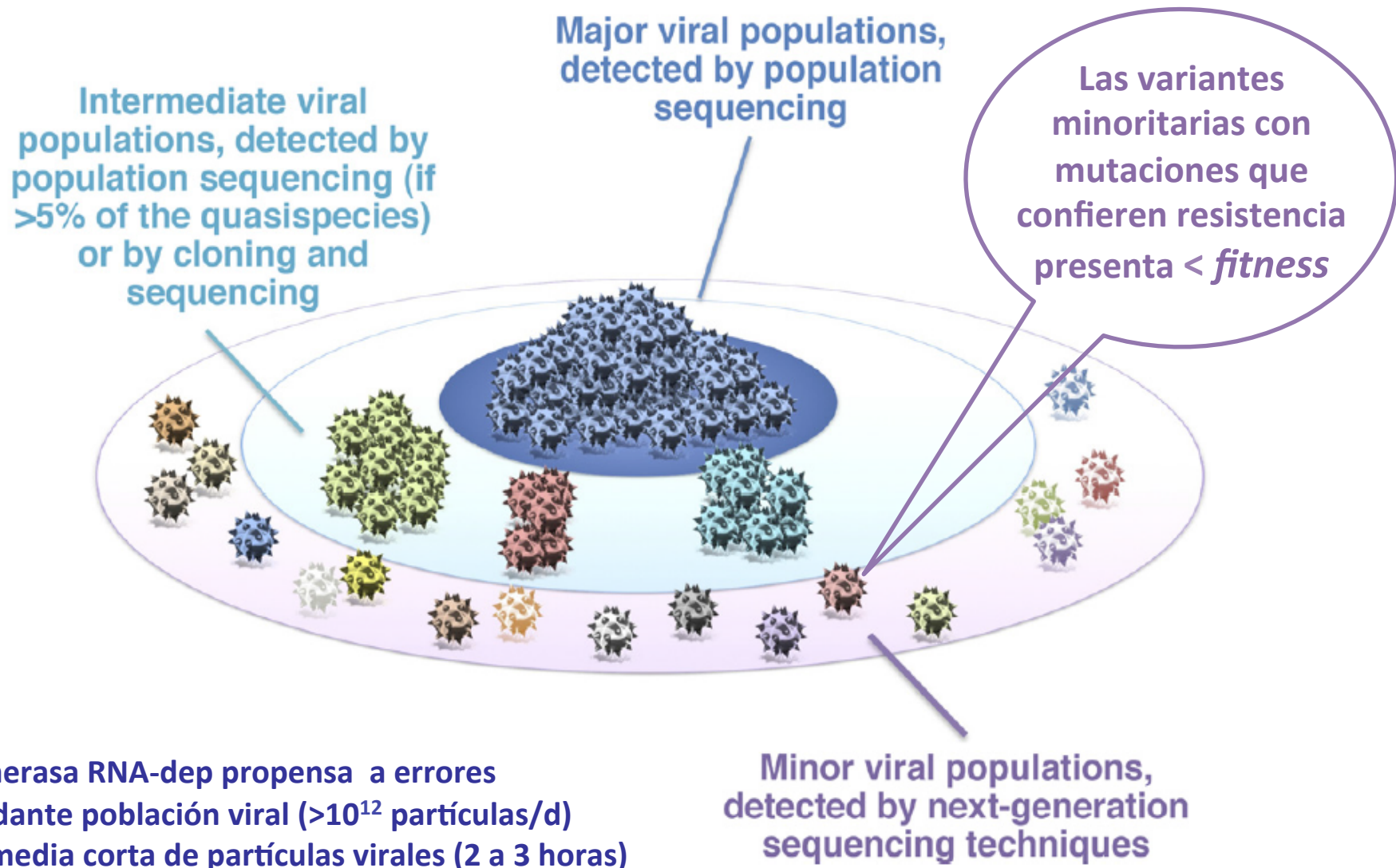
- Barrera genética a la R
- La capacidad replicativa (*fitness*) de las diferentes variantes virales
- La exposición a una concentración determinada de antivirales

Exceptuando los inhibidores NS5B AN, los AADs tienen una baja barrera genética para la R

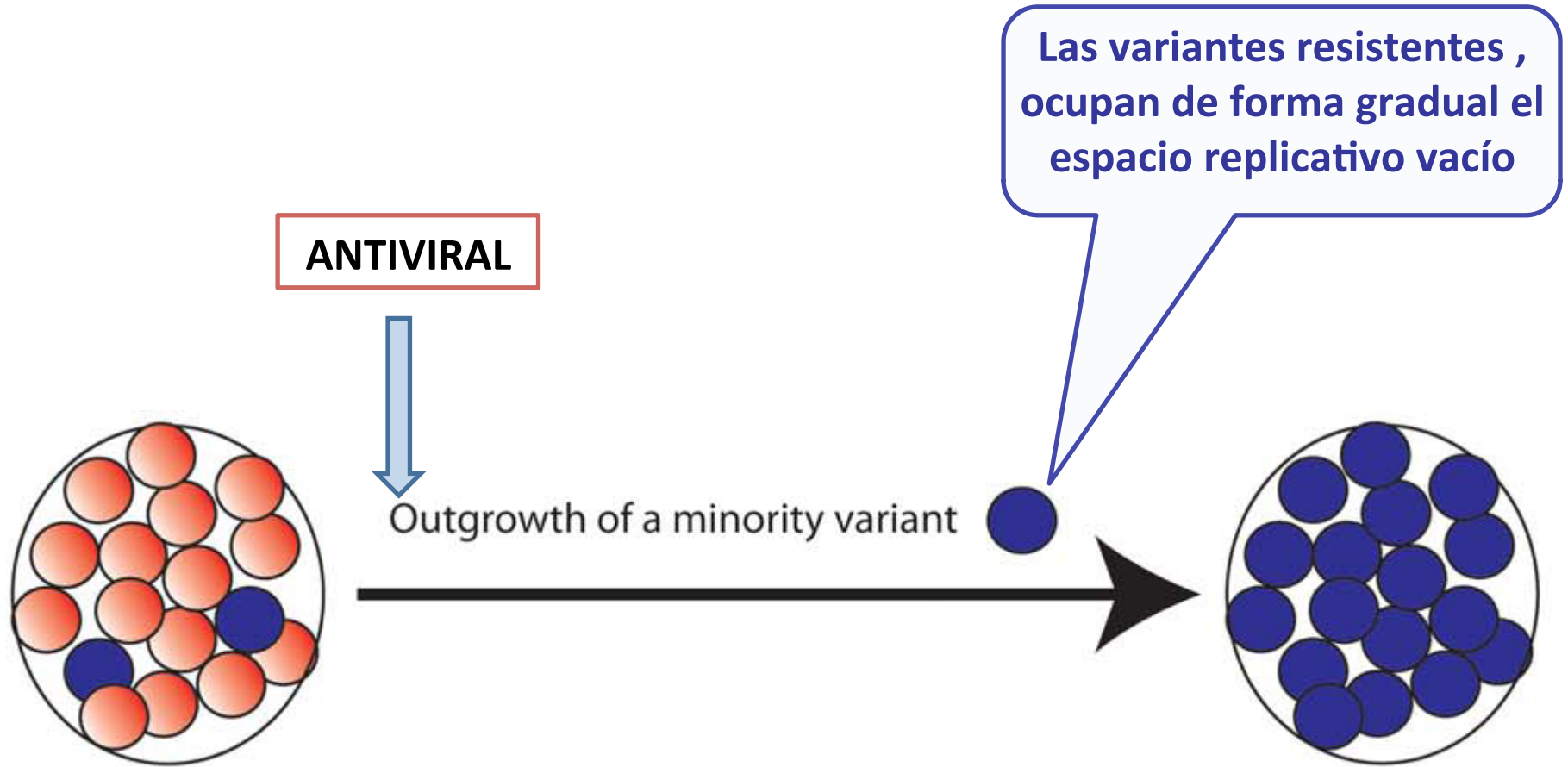


Barrera genética: mutaciones (nº y tipo de base) necesarias que resultan en sustitución (-es) de aa que confieren resistencia.

Variantes minoritarias resistentes existen de forma natural entre las diferentes cuasiespecies de VHC que infectan a un individuo.



Los antivirales inhiben la replicación de la población viral salvaje dominante que es sensible.



No se recomienda los estudios de resistencias basales.

Se obtienen elevadas tasas de respuesta al tto:

- Pacientes con variantes resistentes antes del tto**
- Pacientes sin variantes resistentes de inicio**

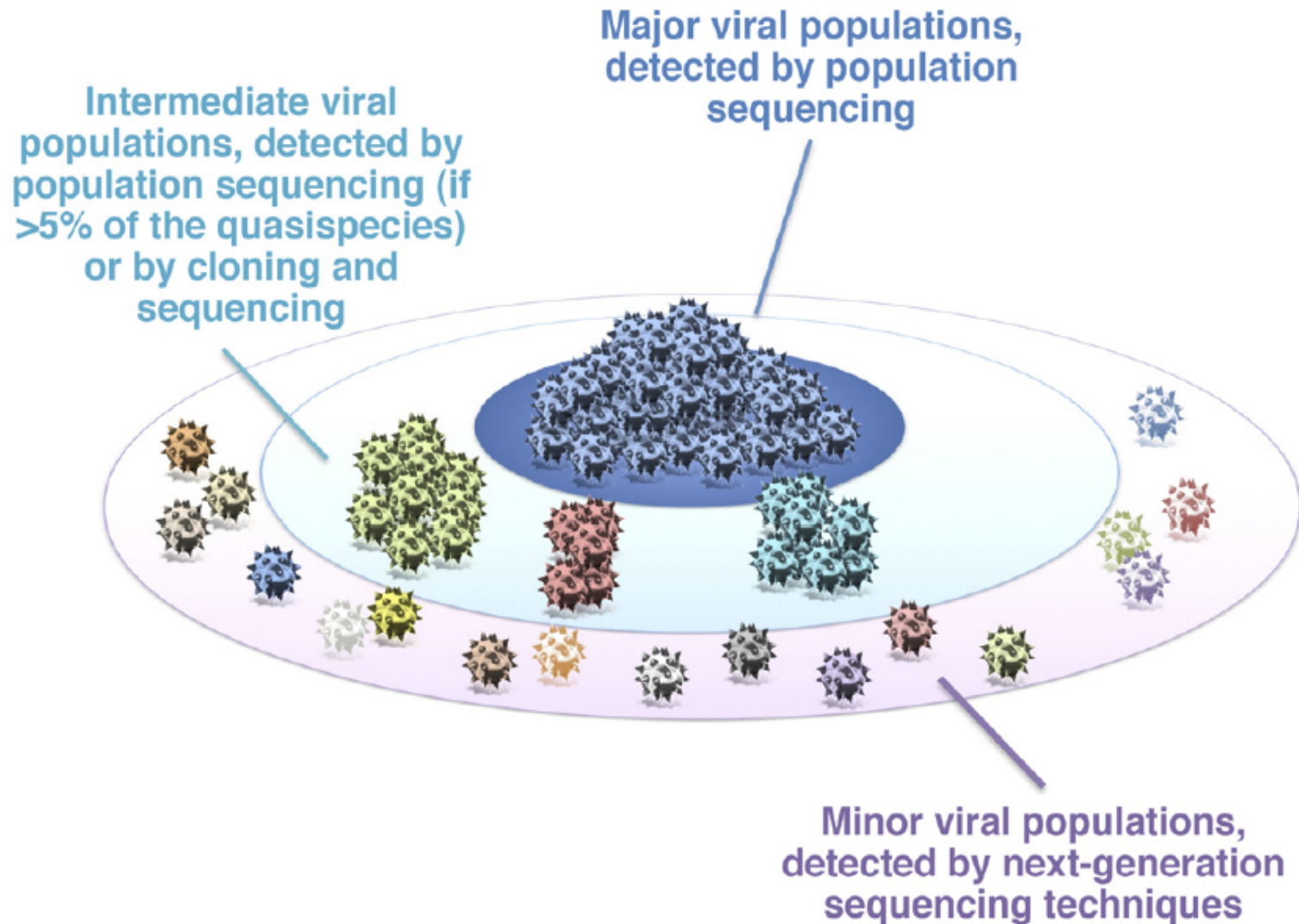
Excepción: Pacientes infectados con G 1a, que van a recibir terapia combinada con INF peg + RIB + Simeprevir
(A1)

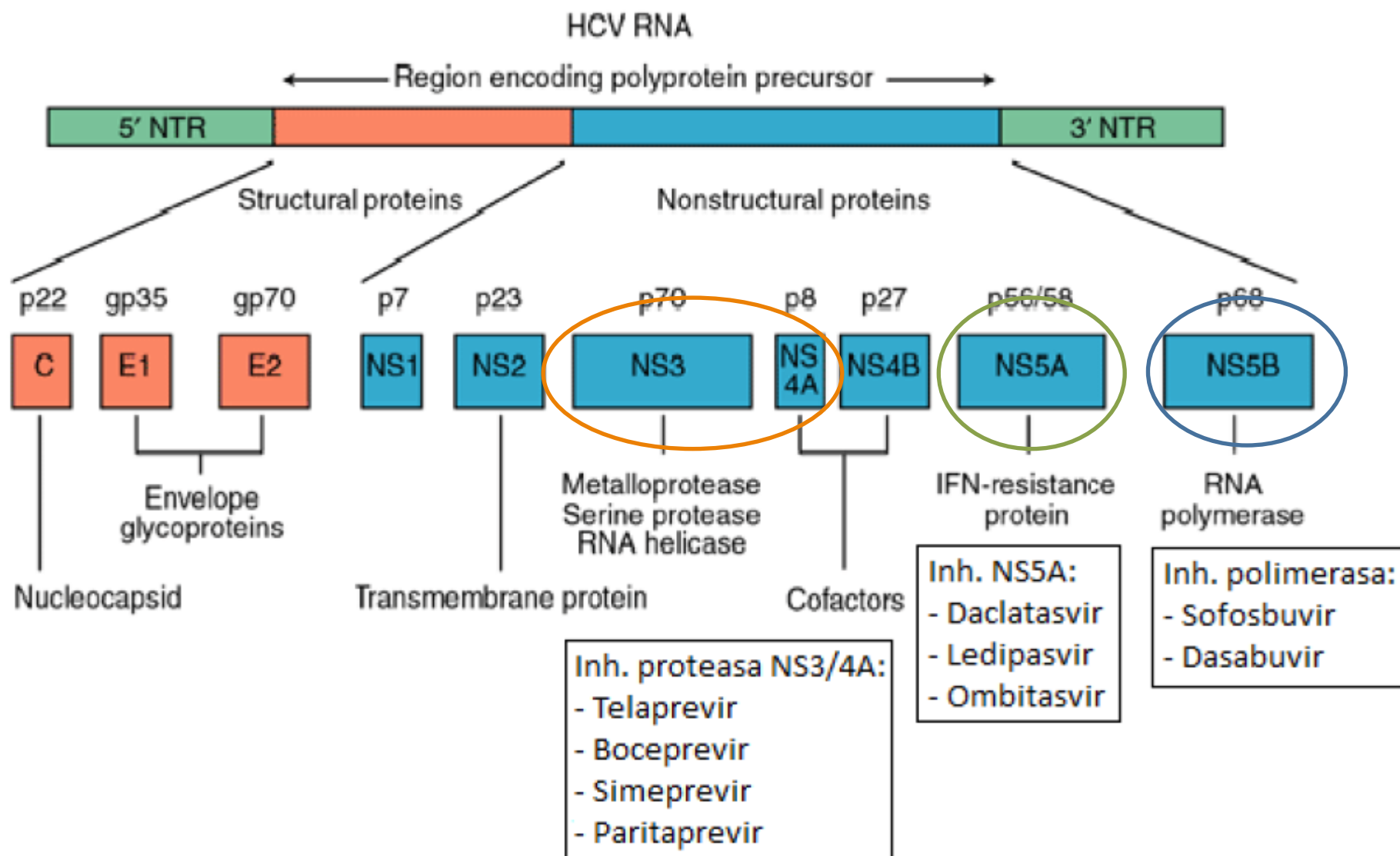
Recomendación de resistencias en fracasos de tratamiento

Pacientes cirróticos con Gn 1a : con fallos en tto previo con inhibidores de NS5A, se recomienda determinación del polimorfismo Q80K en la proteasa (NS3) y de inhibidores de NS5A

Rating: Class IIb, Level C

Los métodos de Secuenciación de Nueva Generación (NGS), aplicados al análisis de polimorfismos de R a los nuevos AAD (regiones NS3/NS4A, NS5A y NS5B), serán de elección en el estudio de R



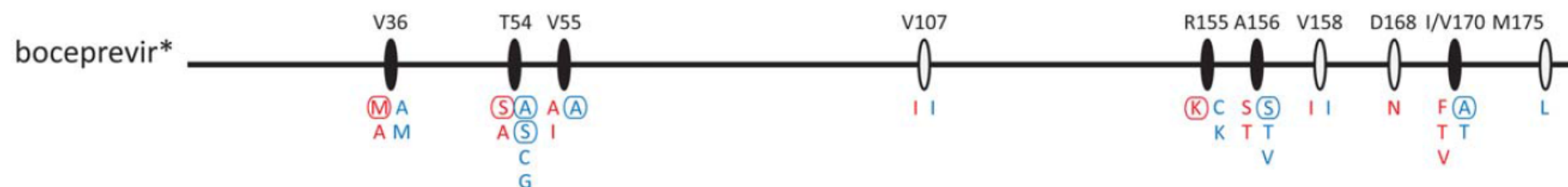


REVIEW

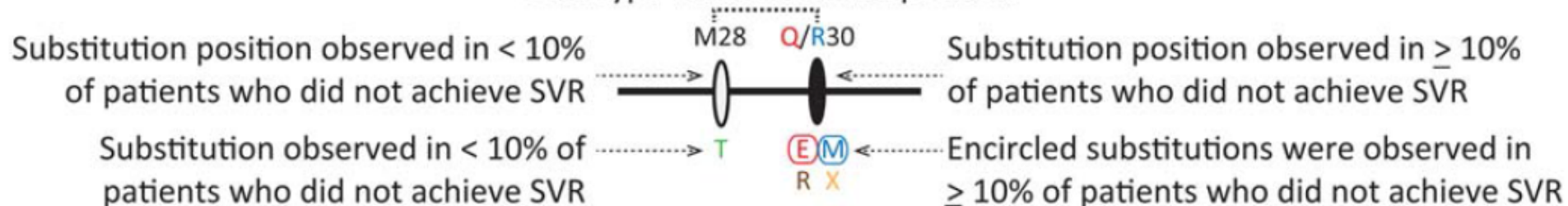
Hepatitis C Virus Drug Resistance–Associated Substitutions: State of the Art Summary

Erik Lontok,¹ Patrick Harrington,² Anita Howe,³ Tara Kieffer,⁴ Johan Lennerstrand,⁵ Oliver Lenz,⁶ Fiona McPhee,⁷ Hongmei Mo,⁸ Neil Parkin,⁹ Tami Pilot-Matias,¹⁰ and Veronica Miller¹

NS3 Protease (180 aa)



Wild-type amino acid and position

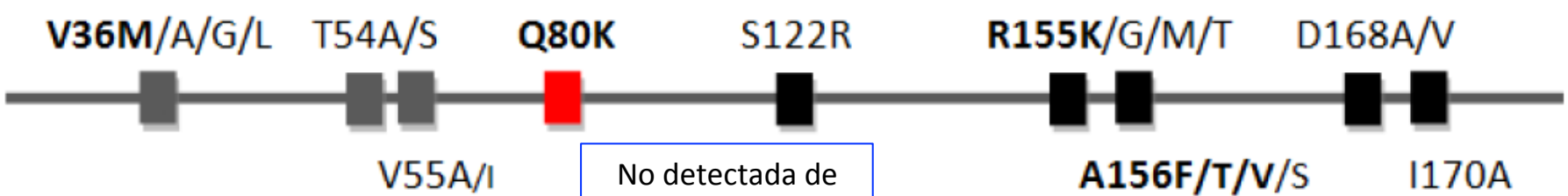


Sustituciones *naturales* más frecuentemente asociadas a R en el tto. con AADs

NS3 Proteasa:

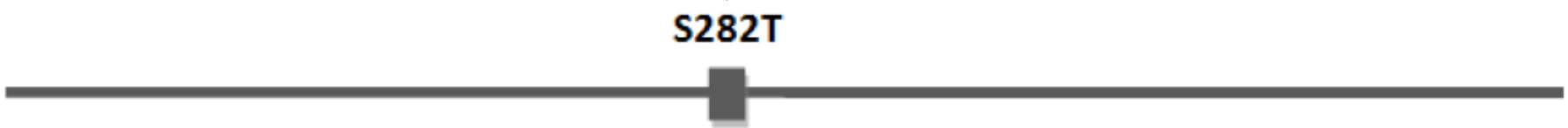
Prevalencia en
G1a (20-50%)

Constitutiva
en G3a



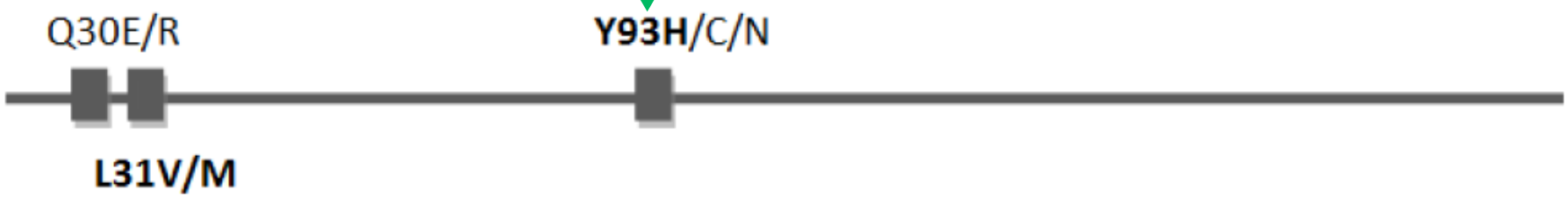
NS5B Polimerasa:

No detectada de
forma natural



NS5A Fosfoproteína:

Peor respuesta a
Daclatasvir G1b y G3



Significado clínico y utilidad de la R a los AAD

Por el momento no se pueden predecir las respuestas al tto antiviral a partir de las variantes de R basales (excepto Q80K en tto SEM), pues son necesarios más estudios para demostrar su relevancia en la práctica clínica.

Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology

Miguel E. Quiñones-Mateu ^{a,b,*}, Santiago Avila ^{c,d}, Gustavo Reyes-Teran ^{c,d},
Miguel A. Martinez ^e



Journal of Clinical Virology 61 (2014) 9–19

454



GS Jr.

GS FLX+

Amplification Method	Emulsion PCR on beads	
Chemistry	Synthesis (pyrosequencing)	
Read length (bp)	400	700
Yield/run (Gb)	0.05	0.9
Primary Error	Indel	
Error rate	~1%	
Run time (hours)	10	20
Virus-related Publications	187	
Advantage(s)	Long reads, maturity	
Disadvantage(s)	Homopolymer misreads, high cost/Mb	

Illumina



MiSeq

HiSeq

Amplification Method	Bridge PCR in situ	
Chemistry	Synthesis (reversible termination)	
Read length (bp)	250	125
Yield/run (Gb)	8	1,000
Primary Error	Substitution	
Error rate	~0.1%	
Run Time (hours)	39	276
Virus-related Publications	129	
Advantage(s)	Easy work flow, maturity	
Disadvantage(s)	Shortest reads, long run	

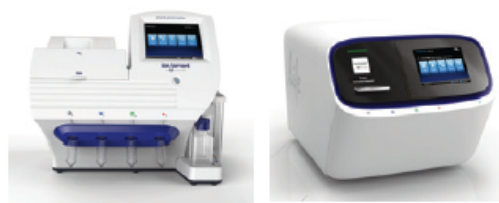
Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology

Miguel E. Quiñones-Mateu ^{a,b,*}, Santiago Avila ^{c,d}, Gustavo Reyes-Teran ^{c,d},
Miguel A. Martinez ^e



Journal of Clinical Virology 61 (2014) 9–19

Ion Torrent



PGM

Proton

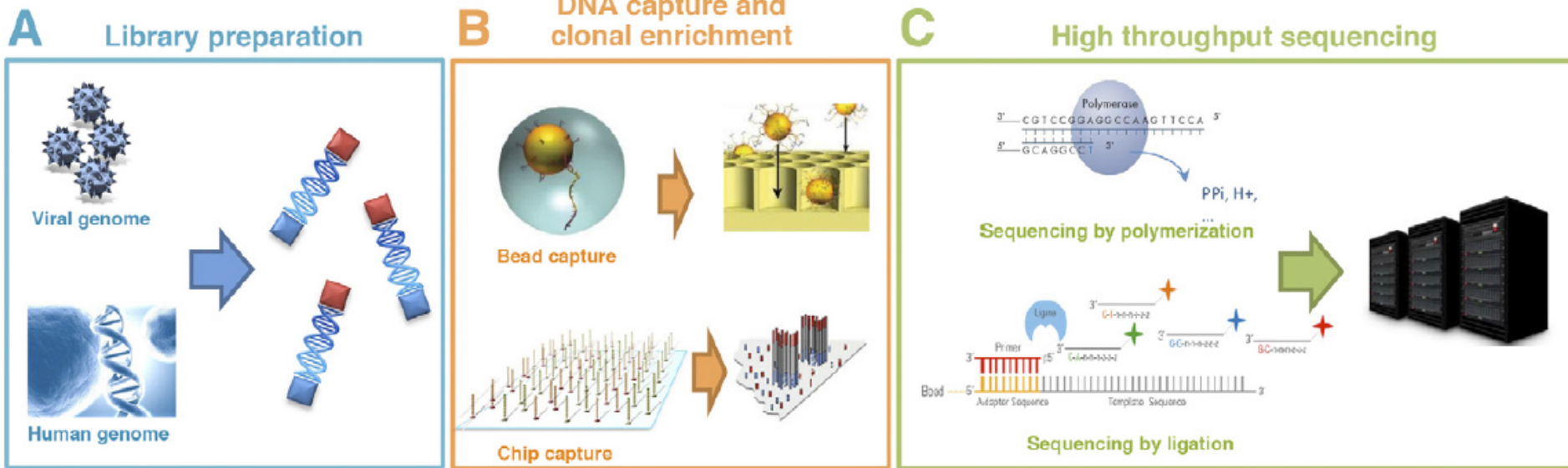
Amplification Method	Emulsion PCR on beads	
Chemistry	Synthesis (H ⁺ detection)	
Read length (bp)	400	200
Yield/run (Gb)	2	10
Primary Error	Indel	
Error rate	~1%	
Run time (hours)	7	4
Virus-related Publications	13	
Advantage(s)	Low cost, fast run	
Disadvantage(s)	Homopolymer misreads	

PacBio



RS II

Amplification Method	No PCR
Chemistry	Single-molecule real-time sequencing
Read length (bp)	8,500
Yield/run (Gb)	0.15
Primary Error	Indel
Error rate	~13%
Run time (hours)	2
Virus-related Publications	6
Advantage(s)	Longest reads
Disadvantage(s)	High error rate, expensive



Inconvenientes

- Errores de secuenciación (falsos P y N)
- Precio
- Generan gran cantidad de datos difíciles de interpretar
- Necesidad de bioinformáticos....
- Uso restringido a laboratorios de investigación

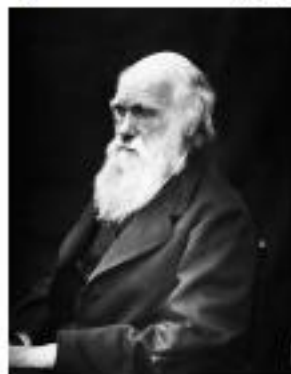
Técnicas de secuenciación de nueva generación

- **Mejor discriminación de genotipos 1a y 1b**
- **Identificación de subtipos de otros genotipos**
 - **Genotipo 4, con > diversidad: problemas de R?**
- **Mejor identificación de infecciones mixtas**
- **Más sensibles para detectar variantes minoritarias y las mutaciones asociadas a R, antes y durante el tto.**



S.XIX

1859



Darwin.
“El origen
de las
especies”

1865



Mendel.
Leyes de
segregación
alélica

1871



Miescher.
Aislamiento
de la
molécula de
ADN

S.XX

1953



Watson, Crick y Franklin.
Estructura de doble hélice del ADN

S.XXI

1990

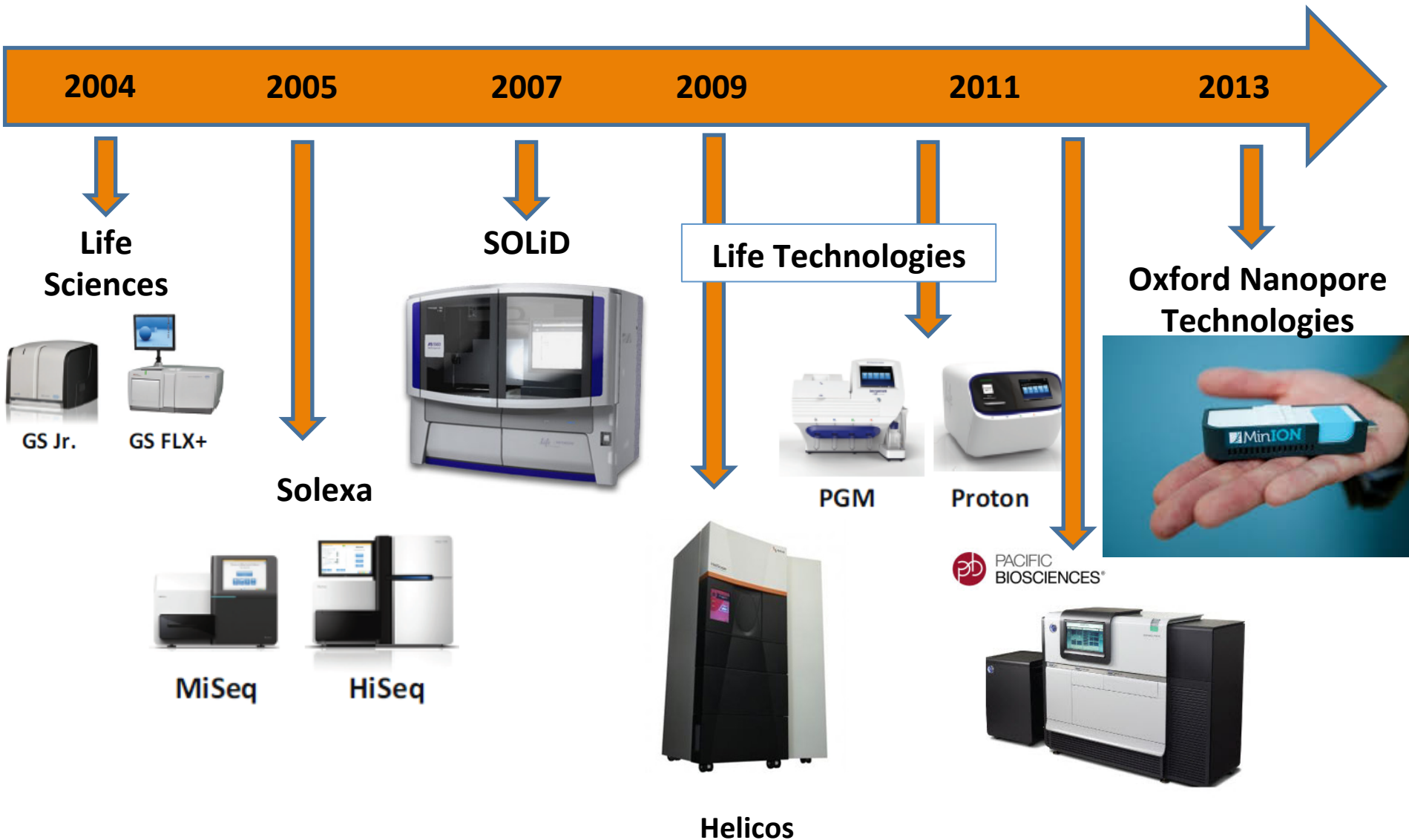


Inicio de la
secuenciación del
genoma humano

2003



**GENOMA
HUMANO
COMPLETO**



...la (R)evolución de las técnicas de secuenciación masiva

MUCHAS GRACIAS

LE XXVII OCTOBRE MDLIII
MOVRT SVR LE BVCHER
A CHAMPEL

MICHEL SERVET
DE VILLENEVVE D'ARAGON

NE LE XXIX SEPTEMBRE

Hace 462 años...

V Centº del nacimiento de
Miguel Servet



CORREOS
ESPAÑA
PERSONAJES

0,80€

RCM-FNMT 2011