



# Genotipat de VHC en el context actual

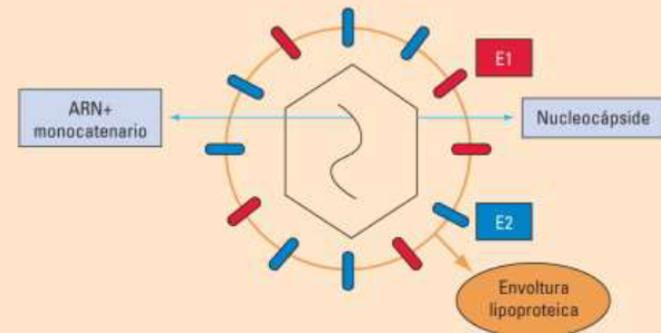
Dra Isabel Viciano  
Hospital Virgen de la Victoria  
Málaga

## Introducción VHC

Familia Flaviviridae

ARN monocatenario

Nucleocápside icosaédrica (proteína C)  
Envuelta: glicoproteínas E1 y E2

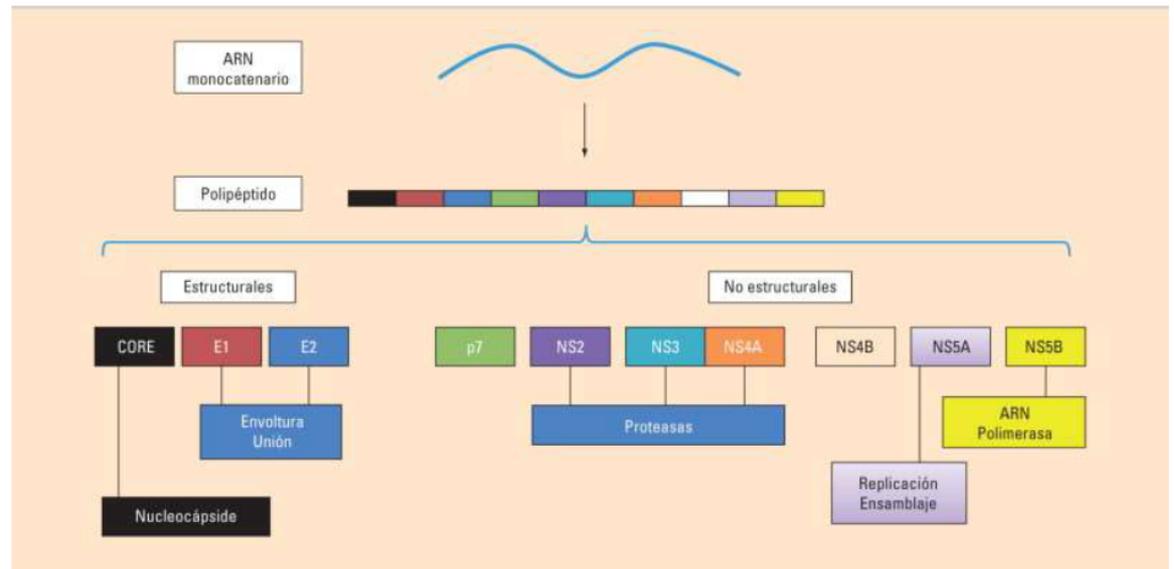


## Proteínas no estructurales

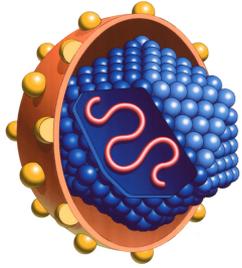
p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B

NS3 es la principal proteasa del VHC

NS5B tiene actividad ARN polimerasa



# Heterogeneidad



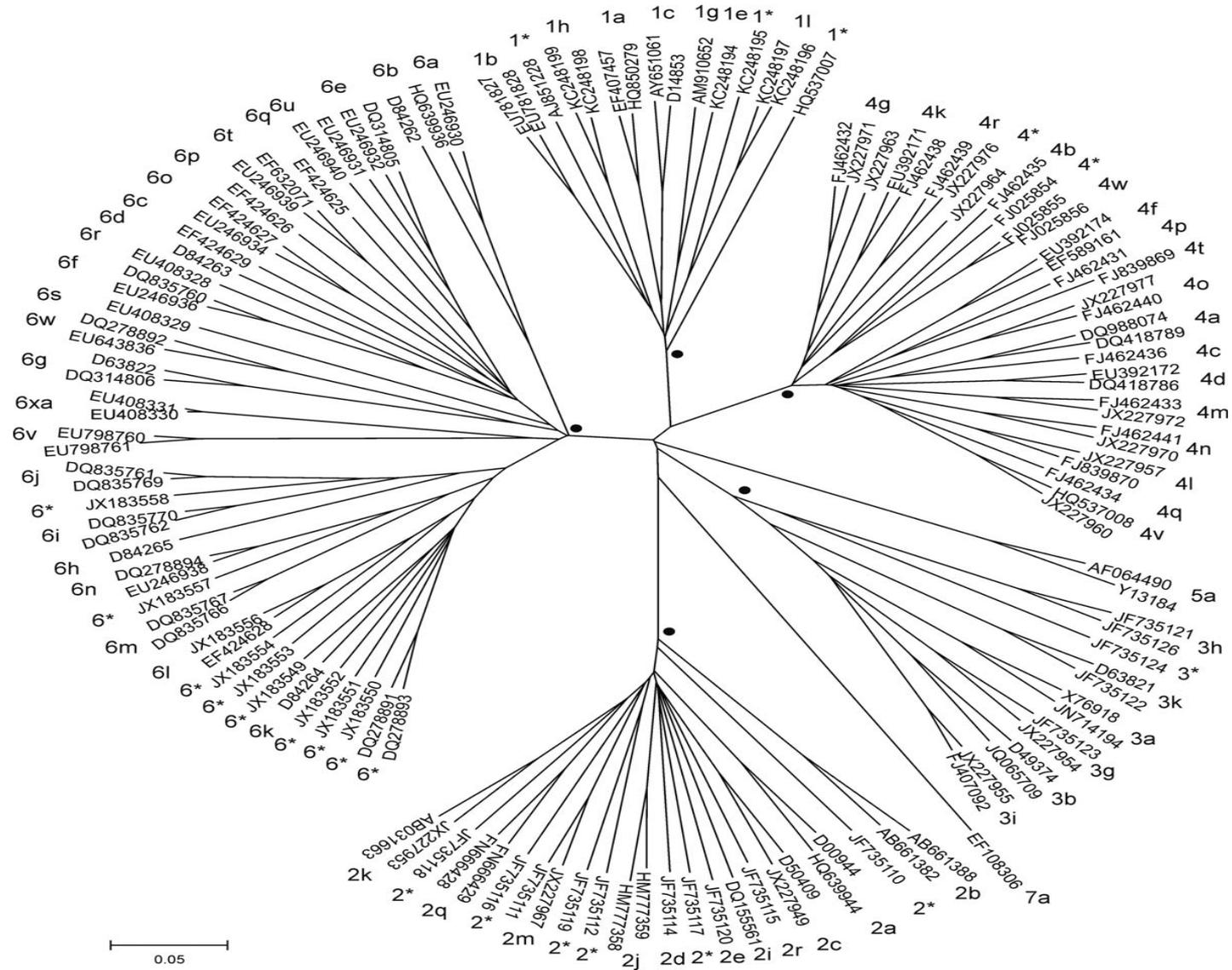
Alta tasa de mutaciones

ARN polimerasa dependiente del virus no posee actividad exonucleasa 3' -5' correctora de errores

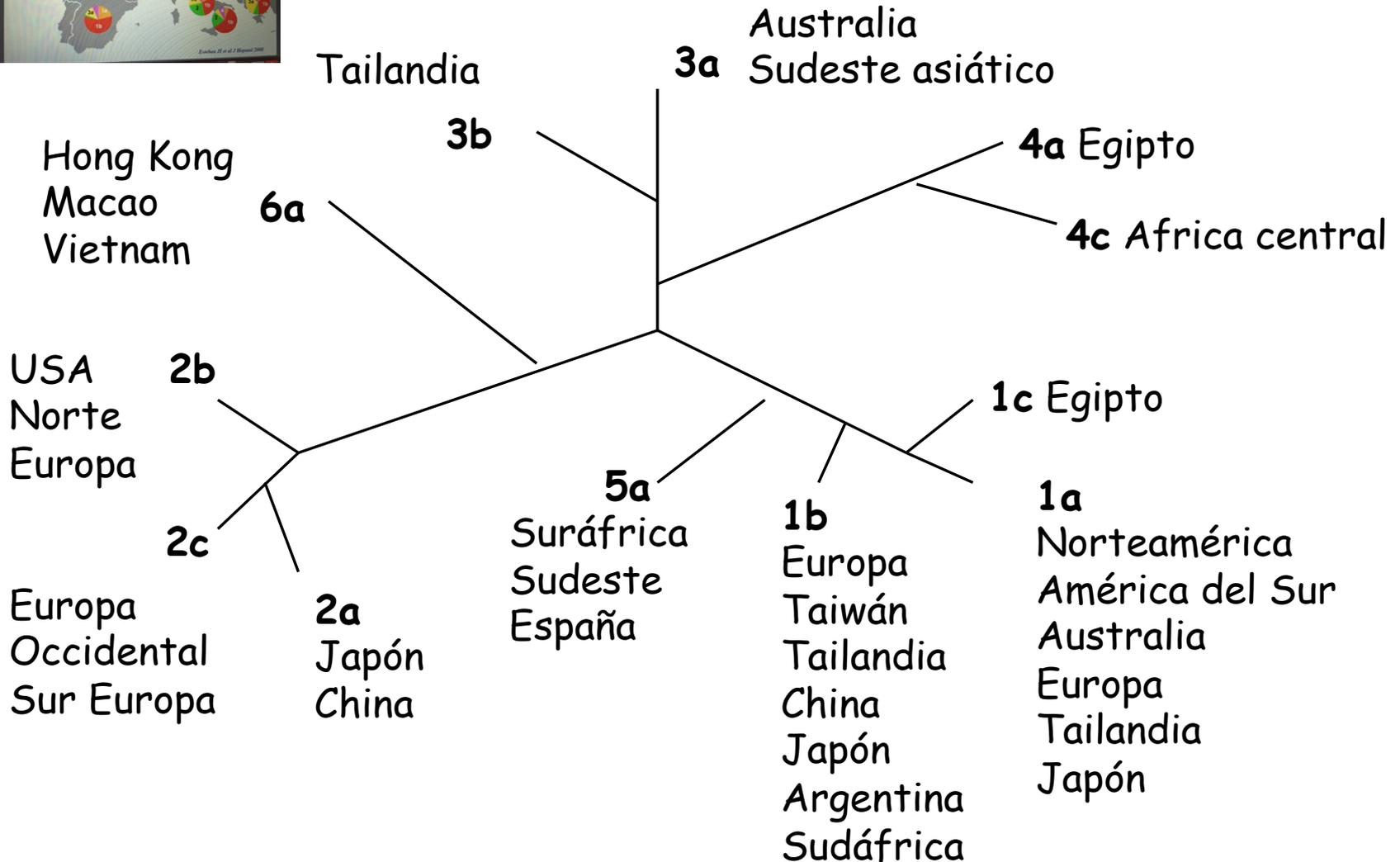
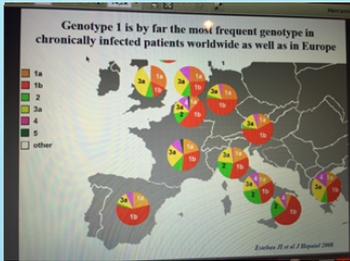
Incremento de la heterogeneidad del virus en cada ciclo de replicación

Heterogeneidad es manifiesta por los genotipos y subtipos

7 genotipos (1-7) distintos y 67 subtipos



# Distribución de genotipos



(GEHEP 005 Study) . 2011-2015

Informe de epidemiología  
molecular genotipos VHC  
en España 2011-2015

15140 pacientes de 24  
hospitales pertenecientes  
a 9 comunidades  
autónomas

Andalucía, Aragón,  
Castilla-León, Cataluña,  
Galicia, Islas canarias,  
Madrid, Navarra y País  
Vasco

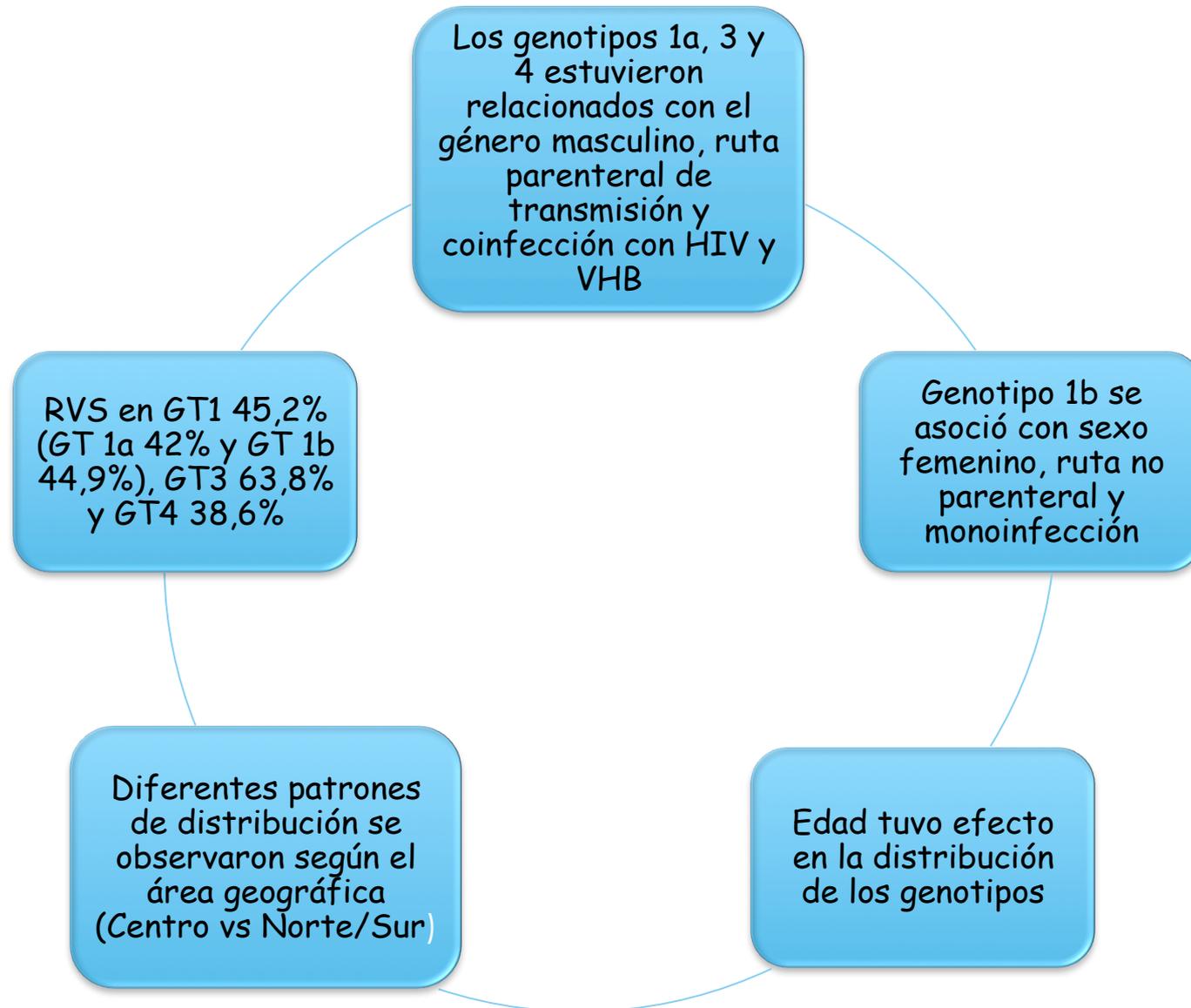
Distribución anual de  
genotipos y subtipos

El género, la edad, la ruta  
de transmisión, coinfección  
HIV/VHB y detalles de  
tratamiento

## Características basales

Edad	51,7 años (IQR 56-44)
Hombres	68.7%
Coinfección HIV	14%
Coinfección HBV	28,2%
Ruta transmisión	
Parenteral	70,2%
Desconocida	26,7%
Genotipos	
1	68,8%
1a	27%
1b	35,9%
2	2,7%
3	16,5%
4	11,9%
otros	0,1%
Métodos genotipado	
LIPA Siemens	42,9%
LIPA Roche	20,1%
Abbott	18,2%

# Distribución genotipos España



## Distribución de genotipos de HCV en distintas regiones europeas 2011-2015

36995 pacientes



Genotipo 1

Genotipo 3

Genotipo 4

Europeos



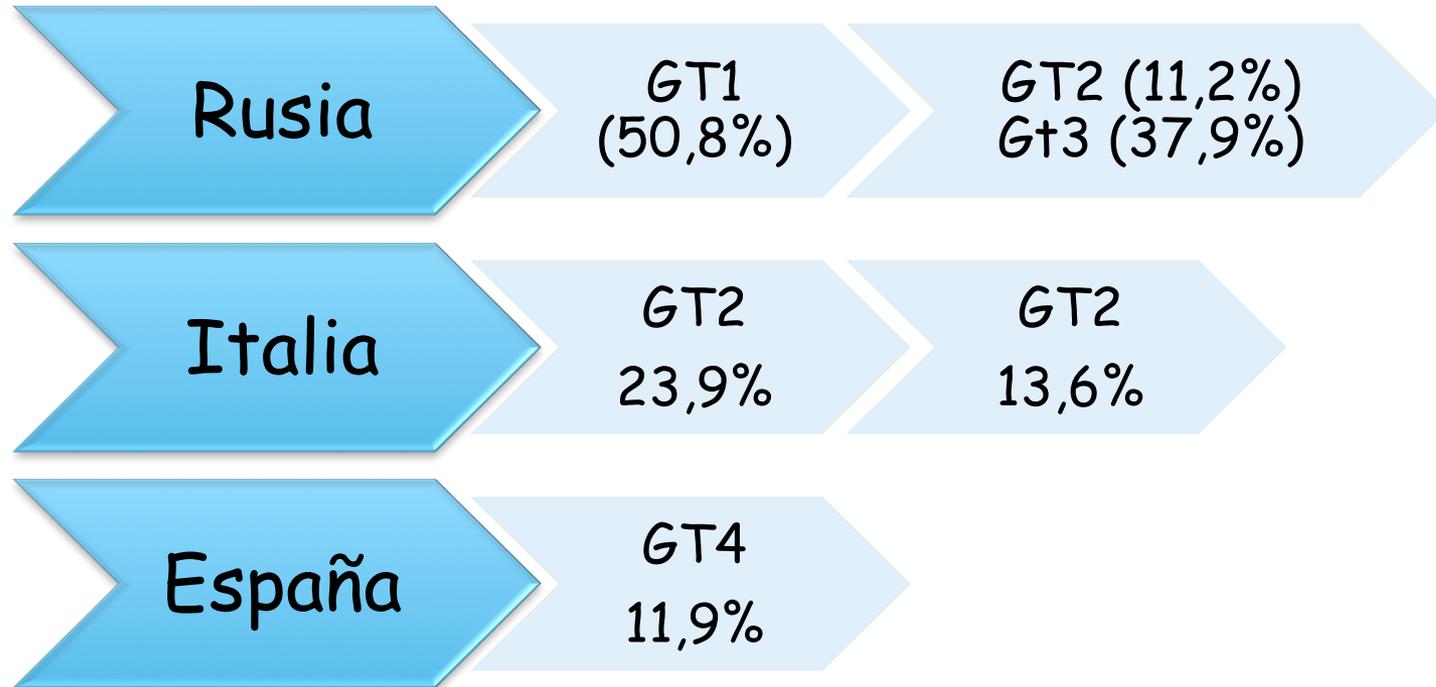
66%

20%

9%

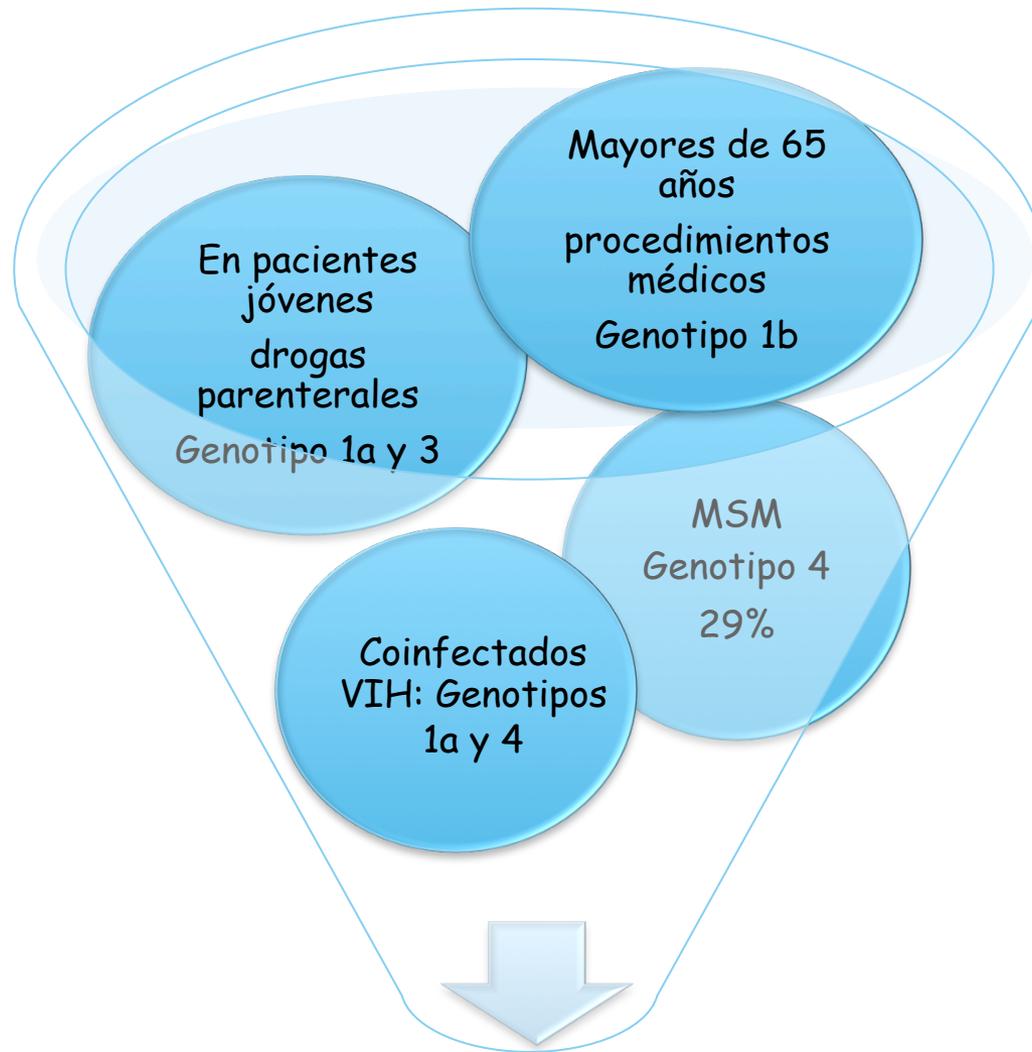
# Genotipos en Europa

No hubo diferencias significativas entre países



# Genotipos en Europa

F Garcia OR 8 I National Conference GEHEP



No se observaron diferencias por sexo



# Genotipos & AAD

# Nuevos AAD

Sofosbuvir

Análogo de nucleótido

Pangenotípico

Simeprevir

Inhibidor Proteasa

GT 1 y GT 4

Daclatasvir

Inhibidor NS5A

Pangenotípico

# Nuevos AAD

Harvoni

Sofosbuvir +  
Ledipasvir

GT1 y GT4

Viekirax

Paritaprevir/  
ombitasvir/  
ritonavir

GT1 y GT4

Dasabuvir

Inhibidor de  
la polimerasa

GT1 y GT4

# Genotipo 1

## RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON GENOTIPO 1

PACIENTES SIN TRATAMIENTO PREVIO	
Pautas recomendadas	<p>Sofosbuvir/Ledipasvir</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Recomendación general, incluyendo pacientes con cirrosis compensada: Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (AI). Pacientes sin cirrosis con ARN VHC &lt; 6,8 log: considerar Sofosbuvir/Ledipasvir durante 8 semanas (BI)</li><li>b. En pacientes con cirrosis descompensada: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas o Sofosbuvir/Ledipasvir durante 24 semanas (AI)</li></ul>
	<p>Paritaprevir/r- Ombitasvir + Dasabuvir (3D) <sup>1</sup></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. <u>Genotipo 1b</u>: 3D durante 12 semanas (AI). Pacientes con cirrosis: 3D + RBV durante 12 semanas (AI)</li><li>b. <u>Genotipo 1a</u>: 3D + RBV durante 12 semanas (AI). Pacientes con cirrosis: 3D + RBV durante 12 semanas <sup>2</sup> (A1)</li></ul>
	<p>Sofosbuvir + Simeprevir <sup>1</sup></p> <p>Pacientes sin cirrosis <sup>3,4</sup>: Sofosbuvir + Simeprevir durante 12 semanas, (AI).</p>
	<p>Sofosbuvir + Daclatasvir</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (AI).</li><li>b. Pacientes con cirrosis compensada y descompensada: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV durante 12 semanas (AI)</li></ul>

PACIENTES CON FRACASO PREVIO A PR	
Pautas recomendadas	<p>Sofosbuvir/Ledipasvir</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (A1)</li> <li>b. En pacientes con cirrosis: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas (A1) o Sofosbuvir/Ledipasvir durante 24 semanas (AI)</li> </ul>
	<p>Paritaprevir/r- Ombitasvir + Dasabuvir (3D) <sup>1</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <u>Genotipo 1b</u>: 3D durante 12 semanas (AI). En pacientes con cirrosis, 3D + RBV durante 12 semanas (A1)</li> <li>b. <u>Genotipo 1a</u>: 3D + RBV durante 12 semanas (AI). En pacientes con cirrosis, 3D + RBV durante 24 semanas (AI)</li> </ul>
	<p>Sofosbuvir + Daclatasvir</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (AI).</li> <li>b. Pacientes con cirrosis: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV x 12 semanas (AI)</li> </ul>
	<p>Sofosbuvir + Simeprevir <sup>1</sup></p> <p>Pacientes sin cirrosis: Sofosbuvir + Simeprevir durante 12 semanas <sup>4</sup> (AI).</p>

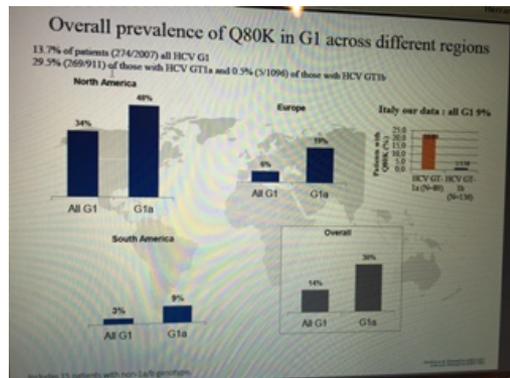
OPTIMIST 1 <sup>7</sup>	Fase 3, abierto, internacional (EE.UU. y Canadá) Pacientes naive y pretratados, sin cirrosis	SOF + SMV x12s SOF + SMV x8s	RVS12: SOF + SMV x12s (n=155): 97% - Naive, 97% - Pretratado, 95% - <u>Gt-1a + Q80K</u> , 96%; Gt-1a sin Q80K, 97%; Gt-1b, 97% SOF + SMV x 8s (n=155): 83% - Naive, 85% - Pretratados, 77% - <u>Gt-1a + Q80K</u> , 73%; Gt-1a sin Q80K, 84%; Gt-1b, 92% - IL28B CC, 100%; CT, 84%; TT, 64% - ARN VHC >4M UI/ml, 77%; <4M UI/ml, 96%
OPTIMIST 2 <sup>8</sup>	Fase 3, abierto, internacional (EE.UU. y Canadá) Pacientes naive y pretratados, con cirrosis compensada	SOF + SMV x12s	RVS12: 83% - Naive, 88% - Pretratados, 79% - Gt-1a + Q80K, 74%; Gt-1a sin Q80K, 92%; Gt-1b, 84% - IL28B CC, 86%; CT, 85%; TT, 79%

GEHEP, Tratamiento Hepatitis C. Junio 2015

Su determinación ha sido muy importante para optimizar la triple terapia con IFN pegilado+RBV+simeprevir  
En los estudios Optimist-2 mostró un impacto del 12% en el tratamiento con Sofosbuvir+Simeprevir en la semana 12 de tratamiento en genotipo 1a en pacientes cirróticos

# 1a + Q80k

El polimorfismo 80K es una variación natural de la proteasa NS3 de VHC que reduce sustancialmente la eficacia de la triple terapia con simeprevir, IFN alfa y RBV. La prevalencia de este polimorfismo varia entre las diferentes países y regiones



2260 muestras

113 hospitales

241 positivas para Q80K  
(10,59%)

27 pacientes

(8 mono y 19 coinfectados)

5 positiva de 80K (18%)  
(1mono, 4 coinfectados)

132 pacientes

10 positiva Q80K (7,6%)

Pcr alelo específica

S Vázquez P45

M Garcia Toro. P46

N Chueca PO-32

I National Conference GEHEP

## RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON GENOTIPO 2

<b>Pautas recomendadas</b>	<p><b>Recomendación general: Sofosbuvir + RBV durante 12 semanas (AI)</b></p> <p><b>Pacientes cirróticos pretratados:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <b>IFN no contraindicado: Sofosbuvir + PR durante 12 semanas (AI)</b></li> <li>b. <b>IFN contraindicado: Sofosbuvir + RBV durante 16-24 semanas (AI)</b></li> </ul>
----------------------------	---

**Tabla 2.** Actualización de las pautas de tratamiento en pacientes con genotipo 2

Estudio	Diseño. Población	Pauta	Eficacia (ITT)
BOSON <sup>1</sup>	Fase 3, aleatorizado, abierto, internacional (UK, Australia, USA, Canadá, Nueva Zelanda) Pacientes cirróticos y pretratados	SOF + RBV x16s SOF + RBV x24s SOF + PR x 12s	RVS12 en pacientes con Gt-2 SOF + RBV x 16s: 87% (13/15) SOF + RBV x 24s: 100% (17/17) SOF + PR x 12s: 94% (15/16)

### Referencias

1. Foster GR, et al. EASL. 2015; Abstract L05

## RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON GENOTIPO 3

<b>Pautas recomendadas</b>	<p>Paciente sin cirrosis: Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (A1)</p> <p>Pacientes con cirrosis:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a. IFN no contraindicado: Sofosbuvir + PR durante 12 semanas (AI)</li> <li>b. IFN contraindicado: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV durante 12 semanas (BII)</li> </ol>
----------------------------	---

**Tabla 3.** Actualización de las pautas de tratamiento en pacientes con genotipo 3

Estudio	Diseño. Población	Pauta	Eficacia (ITT)
BOSON <sup>1</sup>	Fase 3, aleatorizado, abierto, internacional (UK, Australia, USA, Canadá, Nueva Zelanda)	SOF + RBV x 24s SOF + PR x 12s	RVS12: SOF + RBV x 24s (n=126): 87% Cirrosis: 79% SOF + PR x 12s (n=123): 95% Cirrosis: 88%
ALLY-3 <sup>2</sup>	Fase 3, aleatorizado, abierto, internacional	SOF + DCV x 12s	RVS12: No pretratado n=101): 90% Cirrosis: 58% Pretratado(n=51): 86% Cirrosis: 69%
EAP UK <sup>3</sup>	Estudio observacional Cirrosis CPT ≥ 7 No pretratados y pretratados	SOF + DCV ± RBV x 12s	RVS12 (n=114): 71%

### Referencias

1. Foster GR, et al. EASL. 2015; Abstract L05
2. Nelson DR, et al. Hepatology 2015: 1127-35
3. Foster GR, et al. EASL. 2015; Abstract 0002

## RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON GENOTIPO 4

<p><b>Pautas recomendadas</b></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>a. Paritaprevir/r- Ombitasvir (2D) + RBV durante 12 semanas <sup>1</sup> (A1). En pacientes con cirrosis: 2D + RBV durante 24 semanas (BIII)</li><li>b. Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (A1). En pacientes con cirrosis añadir RBV (BIII). En pacientes con cirrosis descompensada: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 24 semanas (BII)</li></ul>
---------------------------------------	---

# Diagnóstico Viroológico

## Diagnóstico virológico



Técnicas serológicas  
Detección Anti VHC  
Detección de antígeno



Técnicas moleculares  
Detección carga viral  
por PCR a tiempo real



Detección de genotipo de  
VHC

# Genotipado VHC

PCR multiplex  
(Seeplex HCV  
genotyping Kit)  
Seegene

Secuenciación de  
región 5' no  
codificante  
(Trugene 5' NC)

Hibridación  
inversa  
Linear Array  
Roche

Secuenciación  
directa de las  
regiones NS5B,  
E1 o E2

Hibridación  
inversa  
Versant HCV  
Genotyping Kit

PCR a tiempo  
real (Abbott  
HCV GTII)

COBAS 6800 HCV  
Secuenciación masiva  
y análisis filogenético



# TRUGENE VHC 5' NC

RT PCR  
PCR Secuencia



Electroforesis



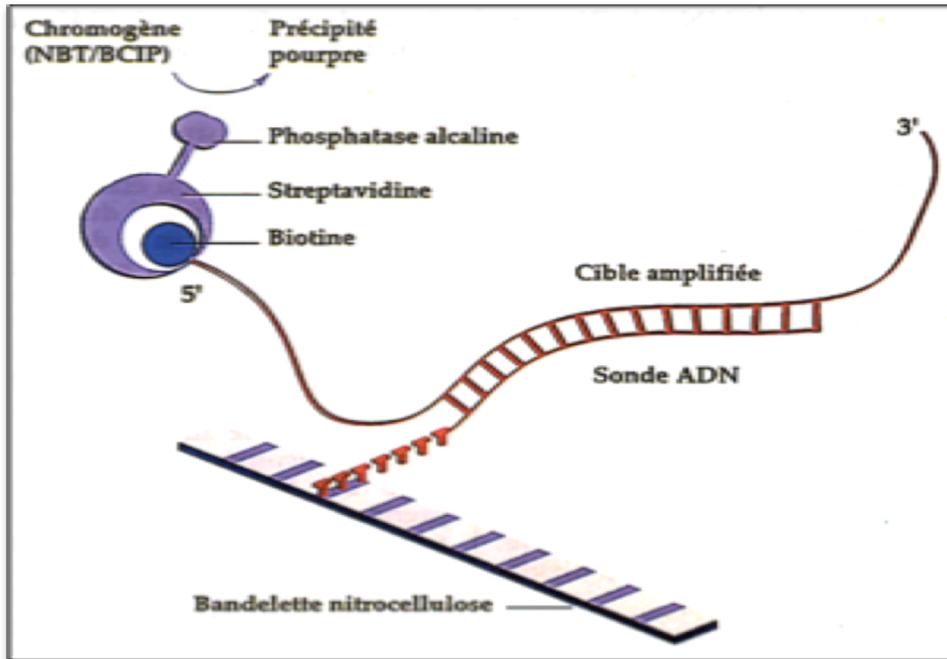
El kit de secuenciación Trugene ha sido desarrollado para la determinación del genotipo de VHC por secuenciación directa de una porción de la región 5' NC del genoma viral

Análisis



- La base de datos TRUGENE™ HCV 5'NC contiene más de 100 secuencias que corresponden a diferentes aislados divididos entre los tipos y subtipos

- Las secuencias de la librería van desde la posición 96 a la 282 de la región 5'NC.



La segunda generación de Line probe assay, un ensayo de hibridación reversa que utiliza sondas tanto de UTR como del core

## LIPA (Line Probe Assay)

Hibridación productos amplificados con sondas genotipo específicas de la misma región fijadas en tiras nitrocelulosa

Reacción inmunoenzimática  
Coloración pardo violeta

# Abbott RealTime HCV Genotype II

K24-90)

Activator  
Tth<sup>+</sup> DNA Polymerase  
Oligonucleotide  
Internal Control



PCR a  
tiempo  
real  
(sondas  
Taqman)

5' UTR,  
NS5b

Región diana

Sensibilidad

500 IU/ml  
(0.5 ml)

Detección  
simultánea  
de los  
genotipos  
1,2,3,4,5,6

Detección  
subtipos  
1a y 1b

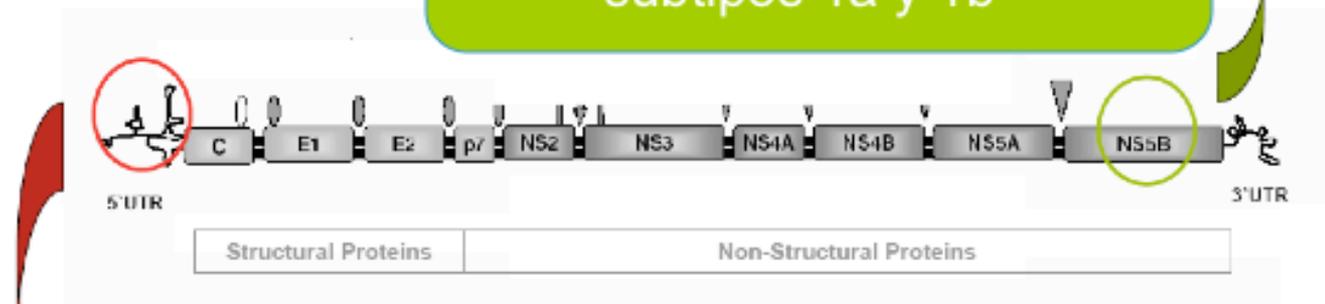
Permite  
detección  
de  
mezclas

Detección de  
genotipos

# Abbott RealTime HCV Genotype II

## Región diana: 5'NTR, NS5b

Esta región permite la mejor discriminación entre los subtipos 1a y 1b



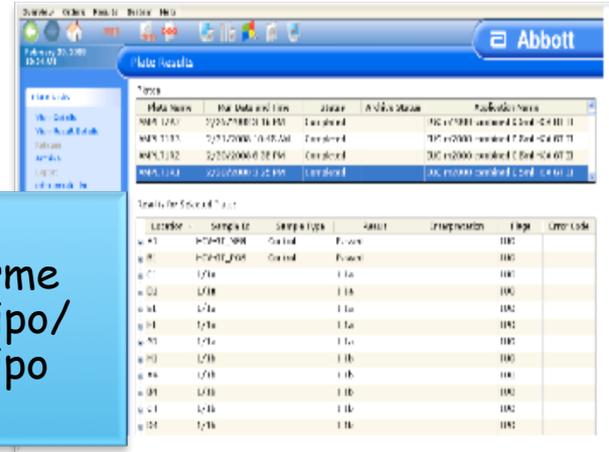
5'UTR es la región mejor conservada del genoma de HCV. Los ensayos cualitativos y la carga viral la tienen como diana

# Abbott HCV GT

3 pocillos por muestra

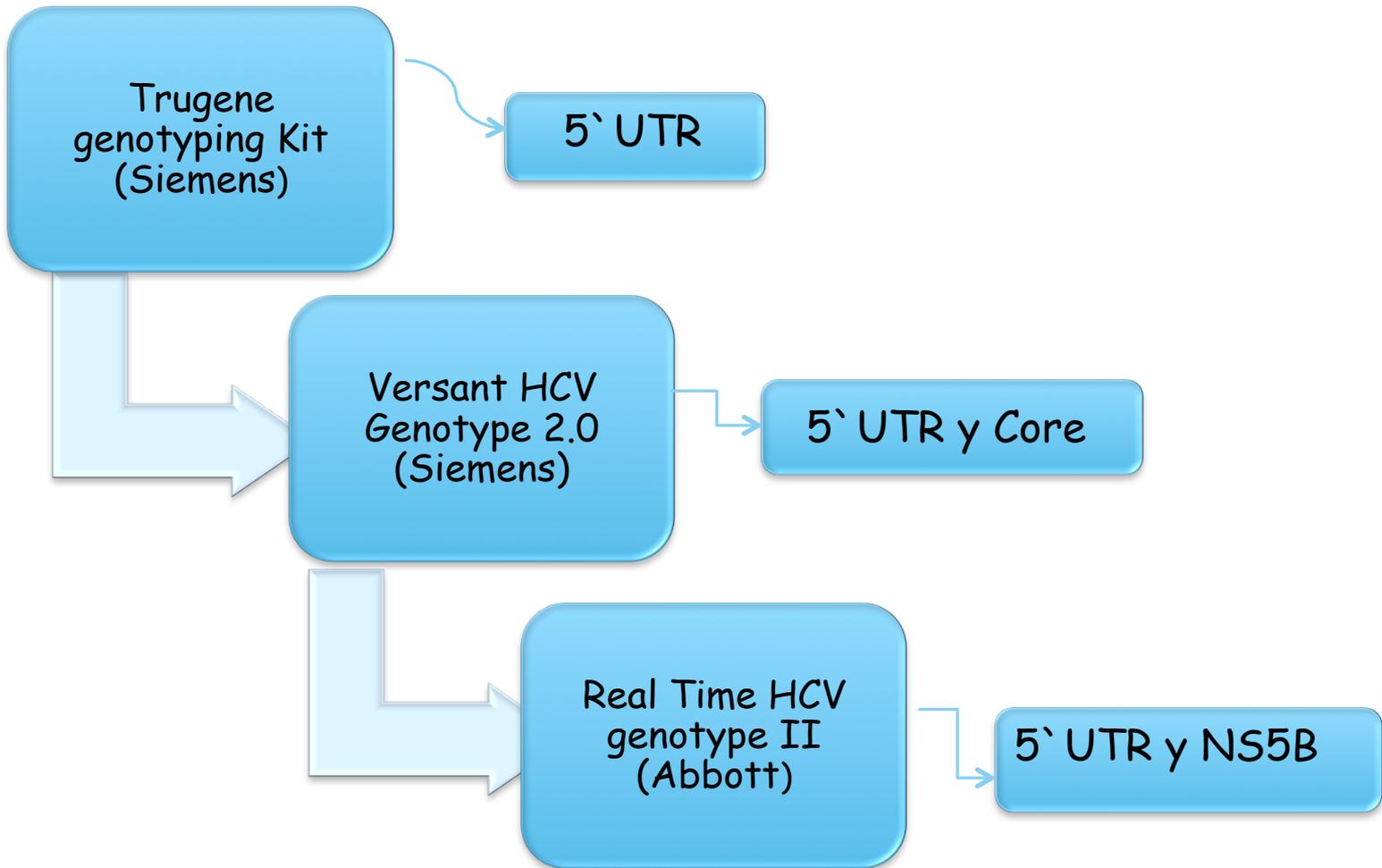
Reporter	Reaction		
	A	B	C
FAM	ALL HCV 5'UTR	GT 2 + 2v 5'UTR	GT 5 5'UTR
VIC	GT 1a NS5b	GT 1b NS5b	GT 4 5'UTR
NED	GT 3 + 3v 5'UTR	GT 1 5'UTR	GT 6 5'UTR
Quasar 670 *	Internal Control	Internal Control	Internal Control
ROX	Passive Reference	Passive Reference	Passive Reference

Informe genotipo/subtipo



Control VHC  
Control Interno  
Muestra





Referencia: secuenciación NS5B

Secuenciación en un  
fragmento interno en  
NS5B (posiciones 7395 a  
8266)



Genotipado: BLAST,  
geno2pheno y phyML.

Referencia:  
secuenciación en  
NS5B

Abbott identificó correctamente todos los subtipos 1a y 1b y los genotipos 2,3,4,5

Discordancia respecto al método de referencia fue del 34% para Trugene

Discordancia respecto a referencia fue del 17% para Versant 2.0

Discordancias mayores: 16% de Trugene, siendo mayor las discordancias entre 1a/1b

Discordancias menores se encontraron para Trugene en el 18%

Versant hubo discordancias mayores en el 10%, todas excepto una casos 1b/1a

Discordancias menores para Versant en el 7%

## Análisis de resultados

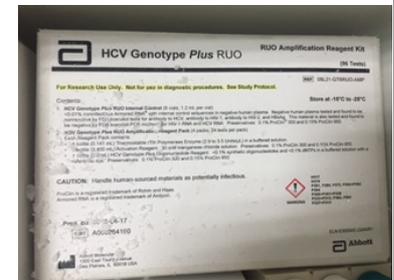
Resultados	768*	Porcentaje
1	584	76%
2	18	2,34%
3	90	11,72%
4	65	8,46%
Indeterminado	6	0,78%

- 5 de las 6 muestras indeterminadas han sido enviadas a Majadahonda gracias al Convenio ISCIII-ABBOTT MVP1007/12
- De las 5 muestras 2 no tenían volumen de muestra suficiente. El resto fueron genotipadas correctamente.
- 4 muestras(0,5%) con resultados de mezclas de genotipos

Genotipo 1	584*	Porcentaje
1a	193	25,1%
1b	359	44,9%
1a, 1b	7	0,93%

\* 3,2 % de las muestras (25 muestras) fueron genotipo 1 no subtipable

- Reactivo HCV Genotype Plus RUO (Core)
- 18 muestras 1 no subtipable fueron reanalizadas usando el reactivo HCV Genotype Plus RUO dando 5 muestras resultado 1a y 14 muestras resultado 1b



## Identificación Genotipo 3

Genotipo 3 es el segundo en frecuencia

Alto riesgo de progresión de la enfermedad

Baja respuesta a los AAD

2009-2014  
1338pacientes  
26 (1,94%)

Genotipo indeterminado  
(Abbott)

## Identificación Genotipo 3

E Martró. PO35 . GEHEP Septiembre 2015

Secuenciación  
NS5B:  
GT 3  
3a (20) 3k (4)

1 bielorrusia  
15 Pakistán  
8 españoles

Pirosecuenciación  
de 5' UTR

24 indeterminadas amplificó  
5' UTR y UPDS con Junior 454  
3 muestras con correcta  
identificación de genotipo 3  
Genotipo asignado por análisis  
filogenético



E Martró. PO35 . GEHEP Septiembre 2015

Genotipado UPDS coincidió con Sanger . No infecciones mixtas ni recombinantes

El alineamiento de las secuencias de UTR evidenciaron la presencia de 1 a 3 polimorfismos en el sitio de unión de la sonda

Las secuencias generadas en este estudio pueden ayudar a mejorar la posibilidad de detectar el genotipo 3

## Conclusiones

En el momento actual la determinación del genotipo de VHC tiene implicaciones a la hora de decidir el tratamiento

Algunas casa comerciales de genotipado cometen errores que pueden condicionar la práctica clínica

En nuestra área geográfica predomina el genotipo 1 seguido del genotipo 3

El genotipo 1a sigue teniendo unas características peculiares para su tratamiento