

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

## **TESIS DOCTORAL**

**Avances en el diagnóstico de la hepatitis B y C e impacto a largo plazo del tratamiento con antivirales de acción directa**

**Doctorando:**

Joan Martínez Campreciós

**Directores de la tesis:**

Dra. María del Mar Riveiro Barciela

Dr. Francisco Rodríguez Frías

**Tutora:**

Dra. María Asunción Buti Ferret

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina, Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2024

**UAB** Universitat Autònoma  
de Barcelona



## Agraïments

Sembla que sí, una tesi doctoral. Batxillerat, Proves d'Accés a la Universitat, primer any de Biologia, 6 anys de Medicina, MIR, 5 anys de residència de Medicina Interna a l'hospital Vall Hebron, gairebé dos anys treballant a Cubal i tornar a Barcelona per començar una nova aventura al món de les malalties tropicals i la salut internacional. En total, uns 16 anys de formació superior, 8 anys de treball, aprenentatge i moltes experiències personals i professionals que m'han fet créixer moltíssim. Des del punt de vista acadèmic, aquesta tesi tanca una llarga etapa i obre les portes a d'altres reptes molt interessants.

Primer de tot, vull expressar el meu agraïment als meus directors i tutora, Dra. Mar Riveiro-Barciela, Dr. Francisco Rodríguez-Frias i Dra. Maria Buti. Els tres m'han fet créixer com a metge i m'han ensenyat el que és la investigació clínica i la recerca al laboratori. La vostra dedicació cap al que feu és màxima i el vostre nivell de coneixements envejable. La vostra exigència m'ha ensenyat a ser humil i voler millorar cada cop més per tal de poder fer recerca de qualitat. Espero que continuem treballant junts en algun projecte, ja sigui a Barcelona o a Cubal, que com bé sabeu, ara és la meva segona casa. Vull agrair també especialment la col·laboració i predisposició de l'Ariadna Rando per endinsar-me en el món de les tècniques diagnòstiques i la recerca al laboratori.

Ana i Patri, pel suport durant la residència i per animar-me a seguir amb el doctorat. He guanyat dues amigues i espero que tot i la distància amb Galícia, seguim en contacte per molts anys. Als amics de sempre, per estar al meu costat en tot moment. Marisa i Israel per donar-nos la possibilitat de treballar a Cubal i viure una experiència que mai oblidarem. A més, us haig d'agrair el suport per acabar la tesi, acollir-me a la tornada i donar-me un vot de confiança per seguir treballant en aquest camp que tant em motiva.

A la meva estimada família, Magda, Joan i Marta, vull expressar amb profunda gratitud el vostre suport incondicional al llarg d'aquests intensos anys de formació i treball. Sense la vostra guia, encoratjament i amor, aquesta jornada no hauria estat possible. Cadascun de vosaltres ha estat una font constant d'inspiració, i el vostre sacrifici i dedicació no tenen preu. M'heu acompanyat amb afecte i comprensió en cada etapa, convertint-vos

en els pilars fonamentals de la meva vida. També volia agrair a la Blacky per ajudar-me a acabar d'escriure les últimes línies de la tesi tot mirant-me des del sofà de casa.

No puc oblidar de mencionar a aquells que ja no hi son, sobretot la Trini, que de ben segur que hagués estat la primera en apuntar-se en un dia tan especial com el d'avui i a la que trobo molt a faltar. I per suposat al Lubis, que sempre en aportava alegria en moments ben difícils.

A tu, Sandra, la meva extraordinària companya de vida i aventures, vull expressar el meu agraïment sincer. La teva presència ha estat un far constant en la meva vida, il·luminant els camins més complexos i compartint amb mi l'experiència única de viure a Angola. La teva fortalesa, suport i amor incondicional han estat pilars crucials que han impulsat la meva determinació a assolir aquests reptes.

Gràcies, gràcies i gràcies, us estimo moltíssim.

## Abreviaturas

**AAD:** Antivirales de acción directa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNccc:** ADN circular covalentemente cerrado

**AG-ONU:** Asamblea General de la Naciones Unidas

**ALT:** Alanina aminotransferasa

**Anti-HBc:** Anticuerpos frente al antígeno del núcleo (core) de las hepatitis B

**Anti-HBs:** Anticuerpos frente al antígeno de superficie de las hepatitis B

**Anti-VHA:** Anticuerpos frente al virus de la hepatitis A

**Anti-VHC:** Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C

**Anti-VHD:** Anticuerpos frente al virus de la hepatitis D

**Anti-VHE:** Anticuerpos frente al virus de la hepatitis E

**APRI:** AST-to-Platelet Ratio Index

**ARN:** Ácido ribonucleico

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**AgVHC:** Antígeno del núcleo del VHC

**CHC:** Carcinoma hepatocelular

**CKD-EPI:** Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

**DE:** Desviación estándar

**EASL:** European association for the study of the liver

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EMA:** European Medicines Agency

**EE. UU:** Estados Unidos de América

**EIA:** Enzima inmunoensayo

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**ET:** Elastografía de transición

**FDA:** Food and drug administration

**HSH:** Hombres que tienen sexo con hombres

**HBeAg:** Antígeno e del virus de la hepatitis B

**HBsAg:** Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

**HDAg:** Antígeno de la hepatitis D

**IFN:** Interferón

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IL28B:** Interleuquina 28 B

**Kb:** Kilobases

**KDIGO:** Kidney disease improving global outcomes

**kPa:** Kilopascales

**mg:** Miligramo

**mL:** Mililitro

**OBV/PTV/r ± DSV:** Omritasvir/Paritaprevir ritonavir ± Dasabuvir

**OCATT:** Organització catalana del transplantament

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RIC:** Rango intercuartílico

**RVS:** Respuesta viral sostenida

**TFGe:** Tasa de filtrado glomerular estimada

**TRS:** Terapia renal sustitutiva

**TSP:** Tarjeta de separación de plasma

**UI:** Unidades internacionales

**UDVP:** Usuarios de drogas por vía parenteral

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VHA:** Virus de la hepatitis A

**VHB:** Virus de la hepatitis B

**VHC:** Virus de la hepatitis C

**VHD:** Virus de la hepatitis D

**VHE:** Virus de la hepatitis E



# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>15</b>
<b>1. <i>Introducción</i> .....</b>	<b>17</b>
1.1.    Hepatitis virales .....	17
1.2.    Virus de la hepatitis A .....	17
1.3.    Virus de la hepatitis B .....	18
1.3.1.    Descripción y epidemiología .....	18
1.3.2.    Hepatitis B aguda y crónica .....	23
1.3.3.    Diagnóstico.....	24
1.3.4.    Tratamiento.....	25
1.4.    Virus de la hepatitis C .....	26
1.4.1.    Descripción y epidemiología .....	26
1.4.2.    Hepatitis C aguda y crónica .....	29
1.4.3.    Diagnóstico.....	30
1.4.4.    Manifestaciones extrahepáticas .....	32
1.4.5.    Tratamiento.....	34
1.4.6.    Impacto del tratamiento con AAD .....	38
1.5.    Virus de la hepatitis D .....	40
1.6.    Virus de la hepatitis E.....	42
1.7.    Nuevas herramientas diagnósticas para las hepatitis virales crónicas.....	43
1.8.    Estrategias de cribado para la infección por VHC y VHB.....	45
<b>2. <i>Hipótesis de la tesis doctoral</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>3. <i>Objetivos</i>.....</b>	<b>49</b>
3.1.    Objetivo primario .....	49
3.2.    Objetivos secundarios.....	49
<b>4. <i>Material y métodos</i> .....</b>	<b>50</b>
4.1.    Seguimiento a largo plazo de pacientes infectados por el VHC con enfermedad renal crónica en estadio terminal tras una respuesta virológica sostenida con antivirales de acción directa .....	50
4.2.    Validación y estandarización del diagnóstico serológico y molecular de Hepatitis C y B en muestras de sangre seca mediante tarjetas de separación de plasma.....	51
4.3.    Análisis de coste-efectividad de la estrategia ReLink-C para recuperar pacientes con infección por VHC perdidos en el seguimiento e impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida de seguimiento y recuperación de pacientes .....	54
4.4.    Análisis estadístico.....	56
<b>5. <i>Resultados</i>.....</b>	<b>58</b>

<b>5.1. PRIMER ESTUDIO: Seguimiento a largo plazo de pacientes infectados por el VHC con enfermedad renal crónica en estadio terminal tras una respuesta virológica sostenida con antivirales de acción directa .....</b>	<b>58</b>
5.1.1. Características basales de los participantes .....	58
5.1.2. Evolución de la función renal tras alcanzar RVS .....	59
5.1.3. Evolución de la enfermedad hepática .....	61
5.1.4. Mortalidad global y comparación de las tasas de mortalidad con una cohorte histórica de pacientes con ERC .....	62
5.1.5. Seguimiento prospectivo .....	64
<b>5.2. SEGUNDO ESTUDIO: Validación y estandarización del diagnóstico serológico y molecular de Hepatitis C y B en muestras de sangre seca mediante tarjetas de separación de plasma.....</b>	<b>66</b>
5.2.1. Resultados serológicos de hepatitis B, C y D .....	66
5.2.2. Resultados virológicos de las hepatitis B, C y D .....	67
5.2.3. Estudio prospectivo en el Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal, Benguela, Angola) .....	71
<b>5.3. TERCER ESTUDIO: Análisis de coste-efectividad de la estrategia ReLink-C para recuperar pacientes con infección por VHC perdidos en el seguimiento e impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida de seguimiento y recuperación de pacientes .....</b>	<b>73</b>
5.3.1. Estrategia ReLink-C .....	73
5.3.2. Impacto de la pandemia por COVID-19 .....	73
5.3.3. Análisis de coste-efectividad .....	74
<b>6. Discusión .....</b>	<b>77</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>88</b>
<b>8. Líneas de futuro: Hacia la eliminación de las hepatitis virales crónicas.....</b>	<b>90</b>
<b>9. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>92</b>
<b>10. Anexos.....</b>	<b>110</b>
<b>10.1 Publicación 1 .....</b>	<b>110</b>
<b>10.2 Publicación 2 .....</b>	<b>111</b>
<b>10.3 Publicación 3 .....</b>	<b>125</b>



## Resumen

En 2016 la organización mundial de la salud (OMS) marcó el objetivo de eliminar las hepatitis virales en 2030, mediante la reducción de la tasa de nuevas infecciones y muertes por el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB). Los antivirales de acción directa (AAD) para el tratamiento del VHC son altamente efectivos, tienen pocos efectos adversos y contraindicaciones por lo que su uso está ampliamente recomendado y aceptado. El desarrollo de nuevas pruebas que permiten la descentralización del diagnóstico y las estrategias de cribado en poblaciones de riesgo o vulnerables podrían incrementar los casos detectados. Las medidas preventivas contra la infección por el VHB, las estrategias de prevención de la transmisión vertical y la mejoría del cribado de hemoderivados y prevención de la transmisión nosocomial podrían disminuir la incidencia de nuevas infecciones por VHC y VHB. El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar el impacto a largo plazo del tratamiento con antivirales de acción directa, validar una nueva técnica diagnóstica para las hepatitis virales crónicas e implementar una estrategia para recuperar pacientes infectados por el VHC perdidos en el seguimiento. En esta tesis doctoral se han incluido tres estudios:

El primer estudio tiene como objetivo describir el seguimiento a largo plazo de un grupo de pacientes con enfermedad renal crónica avanzada e infección por VHC tratados con antivirales de acción directa en 2015. Sesenta y seis pacientes fueron seguidos durante una media de 4.5 [3.7-5.1] años. La gran mayoría (53, 80.3%) presentaban enfermedad renal crónica (ERC) estadio 5 y estaban bajo terapia renal sustitutiva (TRS) antes del tratamiento con AAD. Durante el seguimiento no se observaron cambios en los niveles de creatinina ni en la tasa de filtrado glomerular estimado (TFGe) en los 41 pacientes que no recibieron un trasplante renal. Por el contrario, se observó un incremento de la TFGe en los 8 pacientes que presentaban una ERC estadio 3b-4 al inicio del tratamiento con AAD. A nivel hepático, ningún paciente precisó trasplante hepático, si bien 2 (5.3%) presentaron al menos un episodio de descompensación y se diagnosticó 1 (2.6%) caso de carcinoma hepatocelular. La mortalidad fue elevada (18, 27.3%) y principalmente relacionada con procesos neoplásicos y eventos cardiovasculares. A pesar de ello, la tasa de supervivencia de nuestra cohorte fue significativamente superior a la observada en una cohorte histórica de pacientes bajo TRS de la Organización Catalana de Trasplantes (OCATT).

El segundo estudio tuvo como objetivo evaluar el rendimiento diagnóstico de las tarjetas de separación de plasma (TSP) para sangre seca almacenadas para el diagnóstico del VHC, VHB y virus de la hepatitis D (VHD). El estudio se realizó en las consultas externas del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Se incluyeron 201 pacientes con hepatitis virales crónicas y se compararon los resultados de la sangre seca con muestras de sangre venosa. La sensibilidad y especificidad de las muestras de sangre seca en TSP para el diagnóstico serológico de las tres hepatitis virales fue alta (anti-VHC: 98.7%, 100%; HBsAg: 98.4%, 96.2%; anti-VHD: 84.6%, 100%). La sensibilidad de las muestras de sangre seca en TSP para el diagnóstico molecular del ARN-VHC fue del 100%. La sensibilidad para la detección del ADN-VHB fue baja (53.8%). No obstante, esta sensibilidad aumentó hasta un 95.7% en los pacientes con ADN-VHB mayor a 2000 UI/mL. Este último resultado apunta a que el diagnóstico molecular del VHB mediante TSP es útil para evaluar la necesidad de tratamiento del VHB. La sensibilidad para el diagnóstico del ARN-VHD fue del 70%. La correlación de las muestras de sangre seca en TSP fue muy alta con las muestras de sangre venosa. Además, se realizó un estudio piloto en el municipio de Cubal (Angola) que mostró la viabilidad para usar estos dispositivos en el diagnóstico de las hepatitis virales en regiones con escasos recursos.

El tercer y último estudio tiene como objetivo recuperar pacientes previamente diagnosticados de infección por VHC no tratados con AAD y perdidos en el seguimiento. Para ello se efectuó su búsqueda a través de los resultados de cargas virales reflejas realizadas en el laboratorio del Hospital Vall d'Hebron (estrategia ReLink-C). Además, se evaluó la coste-efectividad de la intervención y el impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida y recuperación de pacientes. En total se identificaron 1591 pacientes con ARN-VHC positivo. Tras la revisión retrospectiva de las historias clínicas, 166 (10.5%) pacientes fueron candidatos a ser contactados y 41 (2.5%) de los ellos recibieron tratamiento y se curaron. La pandemia por COVID-19 favoreció la pérdida de pacientes y por lo tanto un mayor porcentaje de casos fue seleccionado para ser recuperado. La estrategia ReLink-C demostró ser coste-efectiva en la recuperación de pacientes.

## Abstract

In 2016, the first global strategy for the elimination of viral hepatitis was launched with major goals in reducing new infections and deaths from hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV). Direct-acting antivirals (DAAs) for the treatment of HCV are highly effective, have few adverse effects and contraindications so their use is widely recommended. The development of new tests that allow decentralized diagnosis and screening strategies in at-risk or vulnerable populations may increase the number of cases detected. Preventive measures for HBV infection, strategies to prevent vertical transmission and improved screening of blood products and prevention of nosocomial transmission may decrease the incidence of new HCV and HBV infections.

The aim of this doctoral thesis is to evaluate the long-term impact of direct-acting antiviral treatment, to validate a new diagnostic test for chronic viral hepatitis and to implement a strategy to retrieve HCV patients lost to follow-up. Three studies have been included in this doctoral thesis:

The first paper aims to describe the long-term follow-up of a group of patients with advanced chronic kidney disease and HCV infection treated with direct-acting antivirals in 2015. Sixty-six patients were followed for a mean of 4.5 [3.7-5.1] years. The vast majority (53, 80.3%) had chronic kidney disease (CKD) stage 5 and were on renal replacement therapy (RRT) prior to DAA treatment. During follow-up, no changes in creatinine or estimated glomerular filtration rate (eGFR) were observed in the 41 patients who did not receive a kidney transplant. In contrast, a non-significant increase in eGFR was observed in the 8 patients with CKD stage 3b-4 at the start of AAD treatment. Regarding liver disease, 2 (5.3%) patients presented at least one episode of liver decompensation and 1 (2.6%) case of hepatocellular carcinoma was diagnosed. No patient required liver transplantation. Mortality was high (18, 27.3%) and mainly related to neoplastic processes and cardiovascular events. Despite this, the survival rate of our cohort was significantly higher than that observed in a historical cohort of patients undergoing RRT of the Catalan Transplant Organization (OCATT).

The second work aims to validate dried blood spots stored in plasma separation cards (PSC) for the diagnosis of HCV, HBV and hepatitis D virus (HDV). The study was

performed in the outpatient clinics of Hospital Universitari Vall d'Hebron. We included 201 patients with chronic viral hepatitis and compared the results of dried blood spots with venous blood samples. The sensitivity and specificity of dried blood spots (PSC) for the serological diagnosis of the three viral hepatitis was high (anti-HCV: 98.7%, 100%, HBsAg: 98.4%, 96.2% and anti-HDV: 84.6%, 100%). The sensitivity of dried blood spots (PSC) for molecular diagnosis of HCV-RNA was 100%. The sensitivity for HBV-DNA detection was low (53.8%). Sensitivity increased to 95.7% in those patients with HBV-DNA greater than 2000 IU/mL. The latter result suggest that molecular diagnosis of HBV by PSC is useful in assessing the need for HBV antiviral treatment. The sensitivity for HDV-RNA diagnosis was 70%. The correlation of dried blood spots (PSC) was very high with venous blood samples. In addition, a pilot study was conducted in the municipality of Cubal (Angola) which showed the feasibility of using these devices in the diagnosis of viral hepatitis in regions with scarce resources.

The last work aims to retrieve HCV patients not treated with DAA and lost to follow-up through the results of reflex viral loads performed in the laboratory of the Vall Hebron Hospital (ReLink-C strategy). In addition, the cost-effectiveness of the intervention and the impact of the COVID-19 pandemic on the loss and recovery of patients were evaluated. In total, 1591 HCV-RNA-positive patients were identified. After a retrospective review of the medical record of the patients, 166 (10.5%) individuals were candidates for contact and 41 (2.5%) of them were finally treated and cured. The COVID-19 pandemic favored the loss of patients and therefore a higher percentage of cases were selected for retrieval. The ReLinK-C strategy proved to be cost-effective.



# 1. Introducción

## 1.1. Hepatitis virales

El término hepatitis viral hace referencia a la inflamación del parénquima hepático debido a una infección viral que conlleva la destrucción de los hepatocitos y, en mayor o menor medida, un componente de disfunción hepática. Existen múltiples virus que pueden producir inflamación hepática tales como el virus de Epstein Bar, Citomegalovirus, adenovirus o el virus causante de la fiebre amarilla. A pesar de ello, el término hepatitis viral suele usarse para referirse a la infección e inflamación hepática debida a los virus hepatotropos A, B, C, D y E. Estos cinco virus presentan una distribución mundial y están asociados a una gran morbimortalidad, especialmente en el caso del virus de la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC).

## 1.2. Virus de la hepatitis A

El **virus de la hepatitis A (VHA)** es un virus ARN (ácido ribonucleico) que pertenece a la familia *Picornaviridae*. La principal vía de transmisión es la fecal-oral y está íntimamente relacionada con la escasez de higiene y de saneamiento <sup>1</sup>. Tiene una distribución mundial y es considerada endémica de algunas regiones como en África sub-Sahariana. En muchos países de esta región alrededor de un 90% de los niños presentan una serología positiva (anticuerpos anti-VHA IgG) a los 10 años de edad <sup>2</sup>. En contraposición, en nuestro medio, la infección se limita principalmente a los viajeros a zonas endémicas <sup>3</sup>, adictos a drogas vía parenteral y a los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), pudiéndose considerar en estos casos, una enfermedad de transmisión sexual <sup>4</sup>. La infección suele ser asintomática en niños menores de 5 años. Sin embargo, en niños mayores o adultos la presencia de sintomatología es mayor presentando ictericia hasta en un 70% de los casos. Además de la afectación hepática, se han descrito múltiples manifestaciones extrahepáticas como polineuropatías desmielinizantes o anemia aplásica. La hepatitis fulminante es rara, aunque puede llegar al 5% en los adultos <sup>2</sup>. El diagnóstico se realiza mediante la serología (IgM-VHA). La carga viral no se suele realizar. El VHA no cronifica y no existe tratamiento específico para la infección dado que se resuelve de forma espontánea. Únicamente se requieren medidas de

soporte en los casos graves o trasplante hepático en los casos de hepatitis fulminante. Afortunadamente, existen diferentes estrategias preventivas para evitar la infección como son las medidas higiénico-dietéticas y la vacunación. En nuestro medio, la vacunación se realiza como parte del programa universal de vacunación conjuntamente con la vacunación frente al VHB en algunas comunidades autónomas y está recomendada para personas con mayor riesgo de infección y gravedad de la misma como son los viajeros a zonas endémicas, HSH y en las personas añosas o inmunocomprometidas. En países endémicos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda su inclusión en el calendario vacunal <sup>5</sup>.

## 1.3. Virus de la hepatitis B

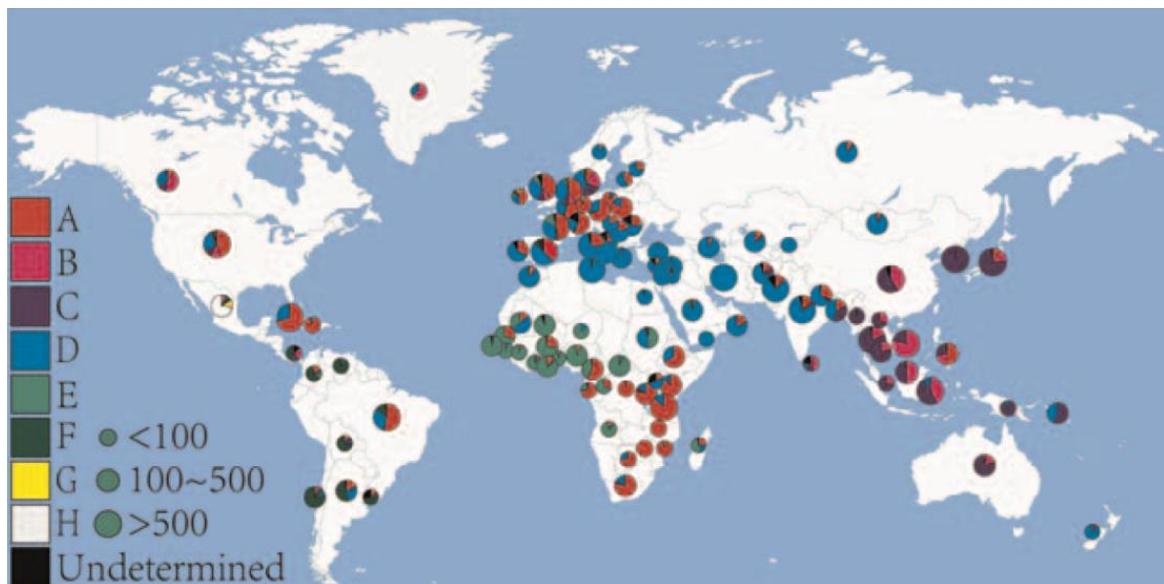
### 1.3.1. Descripción y epidemiología

El virus de la hepatitis B es un virus ADN perteneciente a la familia *Hepadnaviridae* que fue descrito a mediados del siglo XX. Es un virus pequeño y envuelto que se ensambla y replica exclusivamente en los hepatocitos liberando viriones al torrente sanguíneo. Su genoma viral de tan solo 3.2 kb está formado por una molécula de ADN circular no cerrada parcialmente bicatenaria (una cadena completa y otra incompleta) que se conoce como ADN relajado circular (ADNrc). Este genoma tiene 4 regiones codificantes (S, C, P y X), fuertemente solapadas, que codifican 7 proteínas: La región codificante S codifica tres antígenos de la envuelta conocidos conjuntamente como HBsAg (antígeno de superficie) (Pequeño - sHBsAg, Mediano- mHBsAg, y Largo- lHBsAg) que tienen una gran parte común, correspondiente al sHBsAg, por lo que se detectan conjuntamente. La región C codifica dos proteínas que son el componente de la cápside viral o HBcAg (antígeno “core”) y la proteína inmunomoduladora HBeAg que no forma parte de la partícula viral. La región P codifica una gran poliproteína que regula la síntesis de las nuevas moléculas del genoma y la región X codifica una pequeña proteína (HBx) con funciones reguladoras y transactivadoras del ciclo viral y que se ha relacionado con el poder oncogénico del virus.

Durante el ciclo infectivo, y una vez la partícula viral es endocitada mediante el receptor NTCP, la cápside viral es transportada hasta el núcleo de los hepatocitos donde libera el genoma en forma de ADNrc que se convertirá en una cadena de ADN circular

covalentemente cerrada (ADNccc) que forma una estructura cromatinizada episomal. Este pequeño cromosoma es un reservorio intrahepático permanente que actúa como molde para la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) del que derivarán las diferentes proteínas virales. El ARN pregenómico (ARNpg), uno de los ARNm, será encapsulado en el citoplasma mediante proteínas del “core” y la polimerasa viral que realizará retrotranscripción para formar nuevas moléculas de ADNrc dando lugar a nuevos viriones. Esta etapa de retrotranscripción constituye la diana de las terapias mediante inhibidores de la polimerasa. Es importante remarcar que la inhibición de esta etapa de la retrotranscripción impide la formación de nuevos viriones, pero no impide la producción de ARNm a partir del ADNccc persistente en el núcleo por lo que la producción de antígenos virales se mantiene a pesar de que no se observe ADN circulante. Además, la persistente de ARNpg es responsable de la reactivación de la replicación viral en caso de la suspensión del tratamiento con inhibidores de la polimerasa. Asimismo, el ARNpg encapsulado dará lugar a partículas pseudovirales que serán liberadas y podrán ser detectadas de forma que esta detección puede ser un buen marcador de la persistencia de la infección en ausencia de ADN detectable durante la terapia antiviral <sup>6</sup>. Por último, en la sorprendente biología de este virus, existe otro intermediario de la replicación del genoma, el ADN lineal bicatenario. Este ADN puede integrarse de manera aleatoria en el genoma del huésped, y si bien no puede codificar todos los componentes del virus ni puede dar lugar a nuevos viriones como el ADNccc, sí puede transcribir HBsAg y frecuentemente HBx <sup>7 8</sup>. Por ello, se ha sugerido que este ADN integrado impide la eliminación total de la infección y promueve la carcinogénesis <sup>9</sup> pero que no es responsable de las reactivaciones ya que no codifica la polimerasa completa, a diferencia del ADNccc <sup>10</sup>.

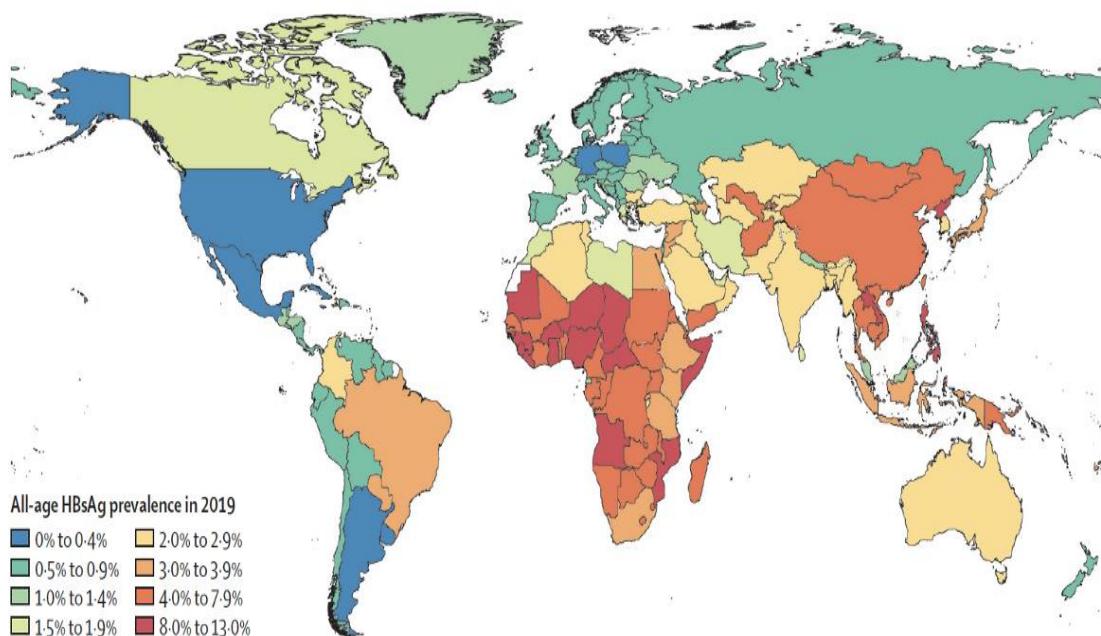
Hasta la fecha se han descrito 10 genotipos (A-J) de la hepatitis B. Los genotipos B y C son predominantes en el sudeste asiático mientras que el A y E predominan en África. En la figura 1 se muestra la distribución mundial de los genotipos del VHB.



**Figura 1.** Distribución mundial de los genotipos de VHB. Imagen extraída de Liu et al., 2021.

El interés por el genotipado y subgenotipado del VHB ha crecido en los últimos años debido a su influencia en la historia natural de la infección. Como ejemplos el genotipo B y C se relacionan con una pérdida tardía del HBeAg y el C con el desarrollo de cirrosis o carcinoma hepatocelular <sup>11</sup>. Es interesante que el genotipo D está fuertemente relacionado con la presencia de la mutación mayoritaria en la región precore (región que precede a la core que da lugar al HBeAg) que evita la producción de HBeAg. Esta mutación es la causa principal de la hepatitis crónica B HBeAg negativa frecuente en el área mediterránea <sup>12</sup>. Otro ejemplo de ello es la pérdida tardía del HBeAg y la persistencia de cargas virales elevadas que sucede con el genotipo C y que explica la mayor transmisión vertical de la infección en el sudeste asiático.

A nivel mundial se estima que existen unos 300 millones de personas portadoras de HBsAg, el marcador serológico de infección activa <sup>13</sup> (figura 2a). Las regiones del sudeste asiático y el África sub-Sahariana son las que presentan mayor prevalencia de infección crónica. En Europa o EE. UU, la prevalencia es baja (<1%) si bien, los movimientos migratorios en masa que han tenido lugar en las últimas dos décadas han cambiado el panorama epidemiológico planteando nuevos retos para la eliminación de la infección en nuestro medio <sup>1415</sup>.



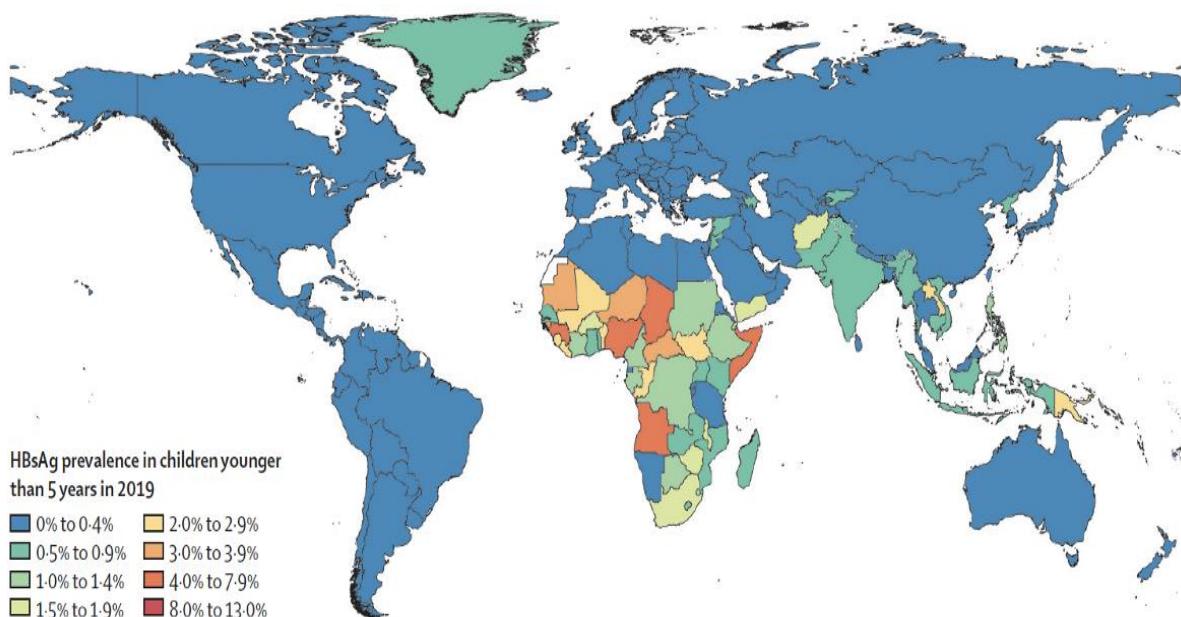
**Figura 2a.** Prevalencia de antígeno de superficie (HBsAg) en 2019. Imagen extraída de Sheena et al.,2022.

Las principales vías de transmisión son la vertical (de madres a los recién nacidos) y horizontal, es decir tras contacto percutáneo o de las mucosas con sangre o fluidos infectados (parenteral o sexual). La forma de transmisión vertical predomina en el sudeste asiático. En esta región hasta un 50% de las mujeres con VHB en edad fértil presentan positividad para el HBeAg<sup>1617</sup>. La persistencia de este antígeno promueve la replicación y la presencia de cargas virales elevadas facilita el fallo de la inmunidad pasiva. Por lo contrario, la forma horizontal precoz predomina en África sub-Sahariana donde gran parte de la transmisión sucede entre lactantes y niños pequeños altamente virémicos. Las formas de transmisión vertical y horizontal precoz son las responsables de la mayoría de las infecciones crónicas<sup>18</sup>.

Afortunadamente, desde inicios de los años 80 disponemos de una vacuna altamente eficaz para prevenir la infección por el VHB. La vacuna contiene HBsAg recombinado y ofrece una protección mayor al 95% frente a la infección tras la administración de tres dosis en la infancia o la juventud<sup>19</sup>. Desde 1991, la OMS recomienda incluir en el programa expandido de inmunización, una dosis al nacimiento, especialmente para neonatos de madres con HBsAg positivo o en aquellas en las que no se puede hacer

cribado de HBsAg y/o se desconoce el estado vacunal. A pesar de la correcta vacunación, los recién nacidos de madres con viremias muy elevadas ( $> 200,000$  UI/ml) tienen mayor riesgo de infección. Por ello, la detección prenatal de estas gestantes es crucial para evaluar la necesidad de realizar profilaxis antiviral (Tenofovir) desde el tercer trimestre hasta el parto o periparto. Por último, existe la recomendación de administrar inmunoglobulina anti-VHB (anti-HBs purificado de donantes) a los recién nacidos de gestantes HBsAg positivas para reducir el riesgo de transmisión vertical.

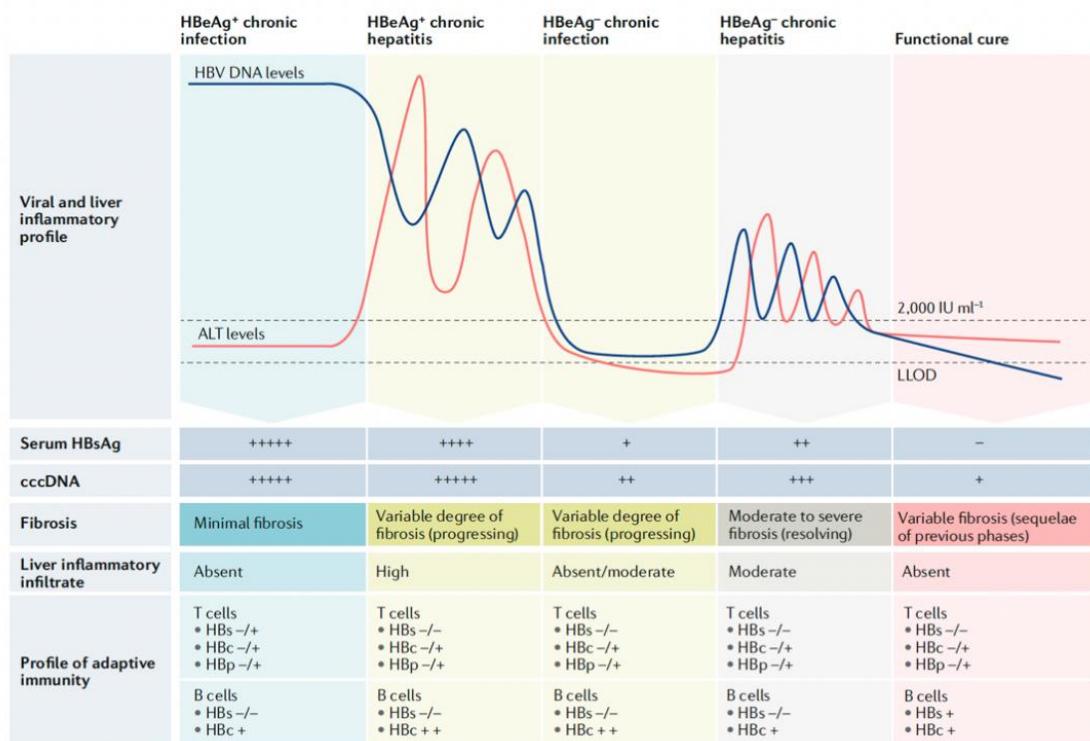
En muchas de las regiones endémicas, la disponibilidad de algunas de estas medidas o el acceso a ellas se ve limitado. En África subsahariana, especialmente en zonas rurales, existe un alto porcentaje de partos en domicilio, largas distancias hasta los centros de atención, dificultades para mantener las vacunas en la cadena de frío, escasez de los medios diagnósticos apropiados para caracterizar a las madres infectadas y práctica inexistencia de inmunoglobulina <sup>20</sup>. A pesar de que se han hecho progresos, en esta región se calcula que la cobertura vacunal de hepatitis B al mes de vida y al nacimiento son del 61% y 1.3% respectivamente <sup>21</sup>. Por todo ello, la prevención de la infección a edades tempranas sigue siendo un reto para eliminación de la hepatitis B. En la figura 2b se muestra un mapa de la prevalencia de HBsAg en niños menores de 5 años como marcador indirecto de la cobertura vacunal del VHB.



**Figura 2b.** Prevalencia de antígeno de superficie (HBsAg) en menores de 5 años en 2019. Imagen extraída de Sheena et al., 2022.

### 1.3.2. Hepatitis B aguda y crónica

La hepatitis B aguda suele ser asintomática en niños y en recién nacidos. En jóvenes y adultos la sintomatología es mayor y la ictericia se presenta hasta en el 50% de los casos. La hepatitis fulminante es rara (<1%) y el riesgo aumenta en los individuos coinfecados con el VHD, VHC o el VIH. La cronificación del VHB se define por la persistencia del HBsAg durante más de seis meses. El riesgo de cronificación de la infección es inversamente proporcional a la edad del contagio. Se estima que hasta un 90% de los menores de 5 años desarrollará una infección crónica tras la infección inicial mientras que esto solo ocurrirá en un 5-10% de los jóvenes y adultos que presenten una infección aguda. La infección crónica se define por la persistencia del HBsAg más de 6 meses. La hepatitis B crónica suele ser asintomática en la mayoría de casos y su evolución depende claramente de la capacidad del sistema inmunitario para controlar la infección. La hepatitis crónica se caracteriza por un aumento de transaminasas persistente o fluctuante y carga viral y daño hepático variables. Las sociedades internacionales como la EASL clasifican la presencia persistente del HBsAg en infección crónica y hepatitis crónica que se diferencian según se indica en la figura 6. De una forma simple se puede asumir infección crónica como la presencia del VHB sin lesión hepática mientras que hepatitis crónica indicaría la presencia de esta lesión, aunque estas dos situaciones no son siempre fáciles de distinguir. La infección crónica se puede caracterizar por cargas virales altas sin daño hepático (como ocurre en los pacientes anteriormente definidos como inmunotolerantes, con HBeAg positivos) o por cargas virales bajas y daño hepático variable, pero ambas sin elevación de transaminasas <sup>22</sup>. Los pacientes con HBeAg se caracterizan por tener mayor replicación viral. A pesar de ello, como se ha indicado, la clasificación de los pacientes en estos grupos puede ser complicada en la práctica clínica habitual. Por eso el manejo de la infección crónica por VHB sigue siendo complejo en la actualidad. En la figura 3 se muestran los diferentes perfiles de infección existentes.



**Figura 3.** Perfiles de infecciones crónicas por hepatitis B. Imagen extraída de Gregory C. Fanning et al., 2019.

### 1.3.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la hepatitis B se basa en la serología y las técnicas moleculares. Los marcadores por excelencia de la infección aguda son el antígeno de superficie (HBsAg) del VHB y de los anticuerpos de tipo IgM frente a la proteína del núcleo o core (anti-HBc IgM). Además, se puede detectar el ADN del virus, así como el antígeno HBeAg. En la práctica clínica es suficiente con la detección de HBsAg y anti-HBc IgM. La positividad de los anticuerpos frente al antígeno de superficie (anti-HBs) indica infección resuelta o inmunización pasiva. La presencia de los anticuerpos frente al núcleo (anti-HBc) nos permitirá diferenciar estos dos escenarios y serán positivos en el aquellos pacientes con infección resuelta <sup>23</sup>. La resolución completa de la infección es excepcional debido a la persistencia del ADNccc y/o el ADN integrado en el núcleo de los hepatocitos. Por ello se utiliza el término de cura funcional en los casos de pérdida del HBsAg. Además, la pérdida del HBsAg con persistencia de la replicación viral puede suceder y se conoce

como infección oculta. Datos de una revisión sistemática reciente apuntan a un 0.82% de prevalencia mundial de infección oculta <sup>24</sup>.

Al igual que sucede con el VHC, después del diagnóstico microbiológico del VHB se debe evaluar el grado de daño hepático mediante técnicas invasivas y/o no invasivas. La ecografía es esencial para descartar la existencia de cirrosis o la presencia de una lesión sugestiva de carcinoma hepatocelular. La elastografía hepática ha mostrado ser una buena herramienta para valorar el estado de fibrosis en los pacientes con hepatitis B crónica pero su precisión es menor que con el VHC y los puntos de corte no están bien definidos <sup>25</sup> existiendo cierta variabilidad, especialmente en los casos con elevación marcada de transaminasas <sup>26 27</sup>. Por todo ello, la biopsia hepática sigue teniendo un papel relevante en el manejo de los pacientes con hepatitis B crónica. Un ejemplo son los pacientes HBeAg negativo con ALT persistentemente normal, pero con cargas virales superiores a 2000 UI/ml. Si bien se ha comprobado que el porcentaje de fibrosis significativa en este subgrupo de pacientes es bajo (2-5%) <sup>28</sup> la correcta evaluación del estado de fibrosis sigue siendo determinante para el inicio del tratamiento antiviral y por ello la biopsia hepática sigue siendo indispensable en algunos casos.

#### **1.3.4. Tratamiento**

Se estima que anualmente menos de 1% de pacientes con infección crónica por VHB pierden el HBsAg de forma espontánea. La negatividad del HBeAg y la baja carga viral se han relacionado con esta seroconversión <sup>29</sup>. Esta cura funcional contrasta con la persistencia de la infección en la mayoría de pacientes. La incidencia acumulada de cirrosis a los 5 años oscila entre un 8 y un 20% de pacientes con hepatitis crónica B no tratados. El riesgo anual de CHC en pacientes con cirrosis es del 2-5% y existen otros factores de riesgo como son la edad avanzada, el origen Africano, la coinfección con el VIH o los antecedentes familiares de CHC <sup>30</sup>. Por ello, las recomendaciones actuales para el tratamiento son aquellos pacientes que presentan elevación persistente de transaminasas, cargas virales elevadas y/o fibrosis al menos moderada. Además, existe la recomendación de realizar tratamiento en adultos jóvenes con antecedentes familiares de CHC <sup>23</sup>.

Existen dos esquemas terapéuticos recomendados en la actualidad, el IFN $\alpha$ peg y los análogos de nucleó(s)tidos. El IFN $\alpha$ peg durante 48 semanas promueve el control de la infección por parte del sistema inmunitario pero sus efectos secundarios limitan mucho su uso. Los análogos de núcleo(s)tidos (Tenovir y Entecavir) son los fármacos más usados para el tratamiento de la hepatitis B crónica debido a su buena tolerabilidad y efectividad a largo plazo para suprimir la replicación viral. La pérdida del HBsAg en pacientes bajo tratamiento antiviral con Tenovir o Entecavir es del 0.22% anual, ocurriendo con mayor probabilidad en pacientes con ADN VHB bajo, elevación de transaminasas <sup>31</sup> y en pacientes infectados con genotipo C <sup>32</sup>. Dado que la pérdida del HBsAg bajo tratamiento con análogos de nucleó(s)tidos es infrecuente, el tratamiento a largo plazo de la infección es la norma en la mayoría de los pacientes con hepatitis B crónica <sup>33</sup>. Los criterios para suspender la terapia son la pérdida del HBsAg con o sin seroconversión a anticuerpos anti-HBs, la seroconversión a HBeAg negativo con carga viral indetectable tras al menos 12 meses de tratamiento de consolidación o en pacientes no cirróticos HBeAg negativos que hayan logrado una supresión virológica a largo plazo y en los que se pueda ofrecer un seguimiento estrecho <sup>23</sup>.

En la actualidad se están desarrollando nuevas moléculas para actuar sobre nuevas dianas como la transcripción del ARN mensajero o el ensamblaje de la cápside del VHB. Además de estas nuevas terapias dirigidas frente al virus, existe un creciente interés en el desarrollo de fármacos que potencien la respuesta inmunitaria, siendo la terapia combinada una gran posibilidad para el futuro <sup>22</sup>.

## 1.4. Virus de la hepatitis C

### 1.4.1. Descripción y epidemiología

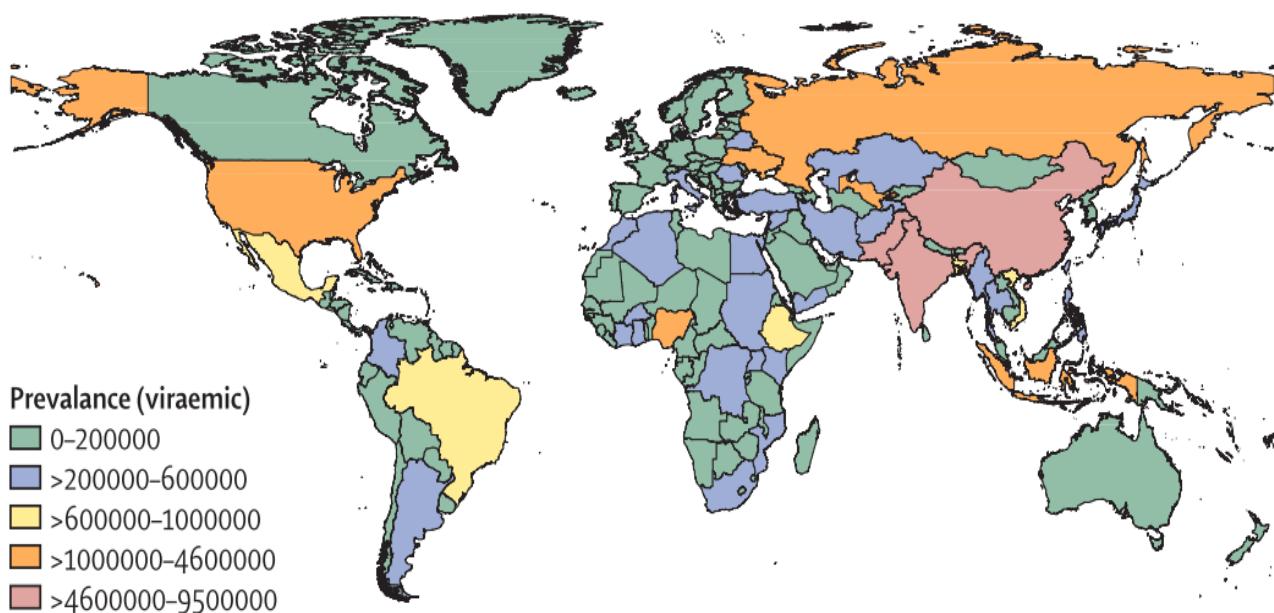
La historia de la hepatitis C es relativamente corta y llena de éxitos gracias a los esfuerzos de muchos científicos que persiguieron de forma incansable la identificación del virus y la búsqueda de un tratamiento efectivo. En los años setenta se describieron los primeros casos de hepatitis post-transfusionales no relacionadas con el VHA, VHB u otros virus causantes de hepatitis como el Epstein-Barr. El creciente reporte de casos y la sospecha de una etiología infecciosa no conocida fue la norma durante años <sup>34</sup>. Por ello, hasta su descubrimiento, estos casos fueron conocidos como hepatitis no-A no-B.

Pocos años más tarde, varios grupos de investigación demostraron la transmisibilidad de esta entidad mediante modelos animales <sup>35</sup>. No fue hasta 1989, cuando el equipo liderado por M. Houghton consiguió finalmente identificar el ARN del virus de la hepatitis C y la presencia de anticuerpos frente al mismo (Choo et al., 1989) <sup>37</sup>. Tras este hallazgo, que mereció el nobel de medicina en 2020, la sociedad científica ha buscado de forma incansable un tratamiento efectivo para una enfermedad que, hasta hace pocos años, representaba una de las principales causas de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC), y la principal indicación de trasplante en muchos países del mundo como España.

El virus de la hepatitis C es un pequeño virus envuelto con un genoma ARN monocatenario que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Su genoma de 9.6 kb codifica una única proteína que es fraccionada por proteólisis en varias proteínas con diferentes funciones: las estructurales (envuelta y core) y las no estructurales con diferentes actividades en el ciclo viral, entre estas NS3-proteasa y su cofactor NS4A, NS5A-reguladora, NS5B ARN polimerasa que constituyen las dianas de los tratamientos antivirales actuales. Hasta la fecha se han descrito 8 genotipos y 86 subgenotipos del virus. El genotipo 1 es el más prevalente a nivel mundial y en nuestro entorno <sup>38</sup>. La principal vía de transmisión es la parenteral o la sexual tras el contacto con sangre u otros fluidos corporales infectados con lesiones en la piel o las mucosas. La forma de transmisión vertical se ha descrito como una causa frecuente de transmisión en la infancia <sup>39</sup>. A pesar de los esfuerzos, hasta la fecha ninguna vacuna se ha mostrado efectiva para proteger frente a la infección <sup>40</sup>. En los países de alta renta, la infección se concentra en grupos de riesgo bien definidos como son los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) <sup>41</sup> o los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), especialmente entre aquellos coinfecados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>42</sup>. Por el contrario, en países de baja y media renta, además de los grupos de riesgo, la infección está íntimamente ligada a la persistente transmisión nosocomial relacionada con procedimientos médicos como la transfusión de hemoderivados <sup>43</sup>.

A nivel mundial, se estima que 58 millones de personas están infectadas por el VHC, con una incidencia aproximada de 1.5 millones de casos anuales <sup>44</sup>. La distribución de la infección es heterogénea y cada vez más polarizada debido a la variabilidad en la instauración de medidas de control de la infección nosocomial y el desigual acceso al

diagnóstico de la infección y tratamiento que existe entre regiones. En 2016, las regiones con una mayor prevalencia de la infección eran Asia central, sudeste asiático, Norte de África, Oriente medio, el centro de África sub-Sahariana y Europa del este <sup>45</sup>. Más concretamente, se estimó que un 80% de las infecciones se concentran en 31 países, y que el 50% de las mismas ocurría en 6 de ellos (China, Pakistán, Nigeria, Egipto, India y Rusia). En 2016, la OMS publicó la primera estrategia mundial para acabar con las hepatitis virales dentro del marco de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible establecido por la Asamblea General de la Naciones Unidas (AG-ONU) <sup>46</sup>. Desde entonces, la historia ha estado marcada por el éxito y el fracaso facilitado por la pandemia por COVID-19 (Hoenigl et al. 2022). Un buen ejemplo de ello es el caso de Egipto, un país con una alta prevalencia de hepatitis C crónica debido a las campañas masivas que se realizaron para el control de la Schistosomiasis <sup>48</sup>. Este país ha pasado de ser el 5º al 17º país con mayor carga de infección en tan solo 5 años. Por el contrario, Estados Unidos (EE. UU) solo ha experimentado un ligero descenso (0.1%). Este resultado está probablemente relacionado con el propio modelo de sistema sanitario de los EE. UU <sup>49</sup> y la preocupante y creciente epidemia de UDVP <sup>50</sup>. Así pues, datos recientes sugieren que, a pesar de la disminución de la prevalencia a nivel global, estamos lejos de conseguir los objetivos marcados en la AG-ONU para 2030 <sup>51</sup>.



**Figura 4.** Estimación de la prevalencia por país de la infección crónica por VHC en 2020. Imagen extraída de John et al., 2022.

### 1.4.2. Hepatitis C aguda y crónica

La infección aguda por hepatitis C se diagnostica con poca frecuencia ya que hasta el 70-80% de los casos son asintomáticos. Dado que muchos pacientes se diagnostican a raíz de una elevación aislada de transaminasas, se ha propuesto utilizar el término “hepatitis C de reciente adquisición” como la forma más apropiada para referirse a la infección aguda <sup>52</sup>. La hepatitis C de reciente adquisición se define por la presencia de anticuerpos anti-VHC, ARN del VHC y/o antígeno del núcleo del VHC (AgVHC) que no eran detectables en muestras anteriores (en el último año). Si no se dispone de dichas muestras históricas, el diagnóstico se basa en la presencia de ARN-VHC, antígeno del núcleo del VHC en presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHC asociado a una elevación igual o mayor a tres veces de ALT por encima del límite superior de la normalidad en una persona que tenga comportamientos de riesgo en los 6 meses previos y en ausencia de otras causas de lesión hepática aguda.

Un 30% de los casos presentará síntomas a las 3 a 12 semanas después de la infección. Los síntomas son variables, desde una clínica inespecífica en forma de astenia y anorexia hasta dolor abdominal o ictericia <sup>53</sup>. Las transaminasas se elevan sobre la segunda a la octava semana desde la infección con niveles que suelen superar por diez veces el límite superior de la normalidad. Su pico suele antecederse al pico de viremia. A pesar de que la infección aguda puede ser grave, la insuficiencia hepática aguda o fulminante es infrecuente <sup>54</sup>. La infección se resuelve de forma espontánea en aproximadamente un 30% de los casos y la sintomatología suele desaparecer en unas pocas semanas. Como factores predictores de resolución espontánea se han descrito el sexo femenino (tasas de curación del 50%), la edad menor a 40 años, valores elevados de transaminasas, baja carga viral al inicio de la infección, polimorfismos del gen IL28B e IFN-4, la infección sintomática, la presencia de hiperbilirrubinemia ( $>6\text{mg/dl}$ ) y la ausencia de coinfección por el VIH <sup>55</sup>. En la mayoría de los casos, la curación espontánea se produce en los primeros 6 meses (67-86%) o 12 meses (83-95%) tras la infección inicial <sup>56</sup>. Por el contrario, los pacientes con inmunosupresión tales como trasplantados de órgano sólido, las personas que viven con VIH <sup>57</sup> o que están bajo tratamiento

oncohematológico <sup>58</sup> tienen menos probabilidades de curación espontánea y mayor rapidez en la instauración de la fibrosis hepática. En estos casos se debe valorar el tratamiento de la infección en la fase aguda debido a la baja probabilidad de resolución espontánea <sup>59</sup>. Además, datos recientes sostienen la coste-efectividad de realizar el tratamiento de la infección de reciente adquisición en grupos específicos de pacientes como los UDVP para evitar el riesgo de transmisión del VHC <sup>60</sup>.

La infección crónica por VHC está definida por la persistencia del ARN viral más de 6 meses. En la mayoría de casos, la infección crónica es asintomática o paucisintomática. Se ha estimado que la necroinflamación y fibrosis hepática progresiva conllevan la aparición de cirrosis hepática en un 20% de los casos aunque esta cifra varía ampliamente entre las distintas series descritas <sup>61</sup>. Entre los factores que se han asociado a un mayor riesgo de progresión de la fibrosis están el sexo masculino, la raza negra, la edad de la infección (>40 años), el genotipo 3 del VHC, estados de inmunosupresión como el VIH, la coinfección con el VHB, la diabetes, la obesidad y la coexistencia de otras enfermedades hepáticas o hábitos tóxicos como el alcoholismo <sup>62</sup>. Una vez establecida la cirrosis, la morbilidad y mortalidad por el VHC aumenta de manera significativa. Existe un riesgo anual de hasta un 6% de presentar un episodio de descompensación hepática (encefalopatía, ascitis o hemorragia digestiva por hipertensión portal) y de un 5% de desarrollar un CHC. Además, el riesgo de mortalidad al año tras un primer episodio de descompensación hepática oscila entre el 15 al 20% <sup>63</sup>.

#### **1.4.3. Diagnóstico**

El diagnóstico de la hepatitis C está basado en la determinación de la carga viral (ARN) o viremia (análisis virológico) y los anticuerpos anti-VHC (análisis serológico). Las técnicas de laboratorio utilizadas son reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y enzima inmunoensayos (EIA). Para el diagnóstico se utilizan muestras de sangre venosa y plasma y otras menos habituales en nuestro medio como la sangre capilar o la saliva <sup>64</sup>. El ARN del virus en sangre periférica es el marcador más precoz de infección y suele ser detectable a partir de la primera o segunda semana después de la infección inicial. Si nos fijamos en los marcadores serológicos, existe un periodo ventana que suele ser menor a 8 semanas en el que los anticuerpos anti-VHC no son detectables. Por ello, ante

la sospecha de una infección de reciente adquisición, la determinación del ARN viral es el marcador de elección de la infección. Los anticuerpo anti-VHC suelen mantenerse positivos independientemente de la resolución de la infección. Únicamente un pequeño porcentaje de pacientes negativizará estos anticuerpos de forma espontánea, pudiendo también ser negativos en casos de inmunosupresión severa <sup>65 66</sup>. Además de los marcadores anteriormente mencionados, existe otro marcador precoz de infección; el antígeno del núcleo del VHC (AgVHC). Los niveles de esta proteína estructural del virus se correlacionan muy bien con el nivel de viremia a pesar de que suelen detectarse unos días más tarde que el ARN-VHC <sup>67</sup>. A pesar de la buena correlación, la sensibilidad para la detección del AgVHC es menor que para el ARN-VHC detectándose a partir de 3-4 logaritmos de ARN-VHC.

En casos de sospecha de infección de reciente adquisición con elevación marcada de transaminasas que sugiera una infección muy reciente, la determinación de la carga viral es esencial para el diagnóstico debido al periodo ventana en el que los anticuerpos son negativos. En cambio, los anticuerpos anti-VHC están considerados el método de elección en el cribado poblacional, así como para el diagnóstico de aquellos pacientes con elevación asintomática de las transaminasas. En ambos casos, será necesario la posterior determinación de la carga viral para confirmar que el VHC está replicando y es la causa de la elevación de las transaminasas <sup>68</sup>. El genotipado del VHC no tiene una gran relevancia en la práctica clínica habitual, especialmente tras el desarrollo y comercialización de los antivirales de acción directa (ADD) pangénotípicos altamente efectivos. A pesar de ello, es útil para poder diferenciar entre un fracaso del tratamiento o una reinfección, principalmente en pacientes con persisten con conductas de riesgo, y puede tener un valor pronóstico dada la menor efectividad del tratamiento frente a genotipos específicos del virus como es el genotipo 3 <sup>69</sup>.

Después de la confirmación microbiológica de la infección es necesario evaluar el grado de fibrosis hepática que condicionará la duración del tratamiento, el pronóstico y el seguimiento de los pacientes. Para ello existen técnicas invasivas (biopsia hepática) y no invasivas entre las que se encuentran la elastografía de transición (ET) o los biomarcadores no invasivos de fibrosis hepática como los índices APRI o FIB-4. La biopsia hepática es considerada el *gold standard*. Es una prueba invasiva no exenta de riesgos por lo que actualmente se reserva para casos en los que además del VHC, pueda

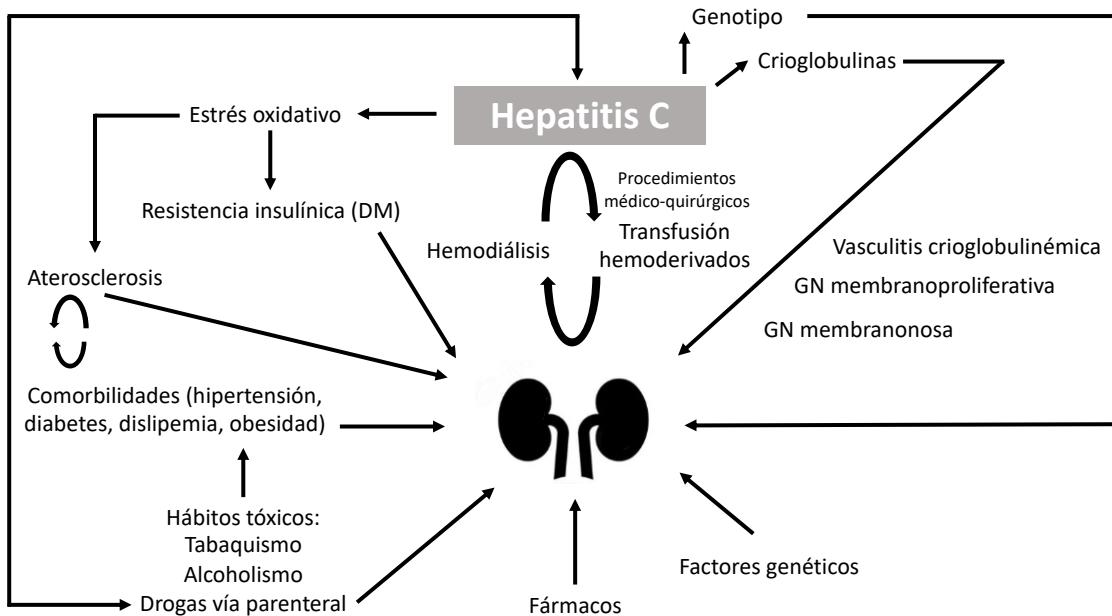
coexistir otra enfermedad hepática subyacente <sup>25</sup>. Tras la realización de la biopsia, se realiza un estadiaje de la fibrosis por medio de escalas como la de Batts-Ludwing o la más ampliamente usada METAVIR. La escala METAVIR tiene 5 estadios que van desde la ausencia de fibrosis (F0) hasta la cirrosis (F4) <sup>70</sup>. Además, es posible evaluar los subtipos histológicos de cirrosis (F4) mediante la escala de Laennec, lo que tiene implicaciones pronósticas para los pacientes <sup>71</sup>. La ET hepática es una prueba rápida y fácilmente reproducible que mide la velocidad de la propagación de una onda elástica de baja frecuencia (50Hz) a través del hígado. Esta velocidad está directamente relacionada con la rigidez hepática: a mayor velocidad, mayor rigidez. La ET ha demostrado una sensibilidad aproximada del 80% para el diagnóstico de fibrosis avanzada y cirrosis en pacientes con infección crónica por VHC siendo actualmente la técnica de elección para la valoración inicial <sup>72</sup>. Sin embargo, su utilidad es escasa para el seguimiento posterior a la curación <sup>73</sup>. Por último, existen múltiples biomarcadores no invasivos que permiten la evaluación del grado de fibrosis hepática mediante parámetros analíticos rutinarios. Algunos de ellos, como el Fibrotest® o el APRI, han demostrado un aceptable poder discriminativo para la detección de fibrosis avanzada y cirrosis. Además, se pueden utilizar de forma sinérgica con la ET hepática <sup>74</sup>.

#### **1.4.4. Manifestaciones extrahepáticas**

A pesar de que la enfermedad hepática y sus complicaciones son la principal causa de morbilidad y mortalidad del VHC, la infección puede producir manifestaciones extrahepáticas hasta en tres cuartas partes de los casos <sup>75</sup>. La fatiga es reportada frecuentemente y suele alterar la calidad de vida del paciente. Entre las enfermedades clásicamente relacionadas están la vasculitis crioglobulinémica, los procesos linfoproliferativos y algunas enfermedades cutáneas como el liquen plano. En las últimas décadas se ha comprobado que la infección crónica por VHC se relaciona con un aumento del riesgo cardiovascular y con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Además, se ha descrito un aumento de la mortalidad de causa no hepática, especialmente por cáncer y enfermedades cardiovasculares <sup>76</sup>.

La relación entre la enfermedad renal y la infección por el VHC está ampliamente descrita, especialmente entre los pacientes virémicos <sup>77</sup>. Aunque la nefropatía directamente relacionada con el VHC es infrecuente, existe gran evidencia de que las

personas infectadas por VHC tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC) y de evolucionar a una enfermedad renal terminal que la población general <sup>78</sup>. La relación entre enfermedad renal y VHC es altamente compleja debido a la presencia de múltiples factores que intervienen en ella. Desde el punto de vista epidemiológico, la asociación entre el VHC y la ERC se debe principalmente a la exposición al virus durante la diálisis y una mayor exposición de los pacientes con ERC a procedimientos médico-quirúrgicos y/o transfusión de hemoderivados. La infección por el VHC puede inducir enfermedad renal por daño tisular citopático e inmunomediado. Los depósitos de inmunoglobulina pueden desencadenar la aparición de una nefropatía crioglobulinémica y glomerulonefritis membranoproliferativa o membranosa, descritas clásicamente como las principales causas de nefropatía relacionada con el VHC <sup>79</sup>. Además del daño renal directo e indirecto, las características de la infección (genotipo 2 relacionado con mayor riesgo de enfermedad renal) <sup>80</sup>, las variables genéticas y las comorbilidades cardiovasculares; el estrés oxidativo generado por la infección crónica por el VHC conduce a un aumento de la resistencia insulínica, un mayor riesgo de diabetes mellitus y una aceleración de la aterosclerosis, contribuyendo al aumento del riesgo cardiovascular y en consecuencia, a la mayor incidencia de insuficiencia renal crónica. Por ello, el VHC ha sido propuesto como un factor de riesgo cardiovascular independiente <sup>8182</sup>. Por último, el riesgo de infección por VHC y de enfermedad renal crónica es mayor en los UDVP. Se ha descrito una mayor prevalencia de microalbuminuria entre estos pacientes, así como mayor incidencia de amiloidosis y enfermedad renal relacionada con el depósito de sustancias derivadas del uso de opioides <sup>8384</sup>. En la figura 5 se muestran las variables relacionadas con el VHC y la enfermedad renal.



**Figura 5.** Factores relacionados con el VHC y la insuficiencia renal

#### 1.4.5. Tratamiento

El tratamiento de la hepatitis C ha experimentado cambios sustanciales en la última década gracias a la aparición de los AADs. La respuesta al tratamiento se define por la eliminación persistente de la carga viral (respuesta viral sostenida, RVS). La historia del tratamiento de la hepatitis C crónica se inició años antes de la caracterización del virus<sup>85</sup>. La aparente efectividad del interferón para el tratamiento de la hepatitis B crónica hizo que se publicaran los primeros resultados de su efectividad en casos de hepatitis no-A no-B<sup>86</sup>. A raíz de estos resultados, se realizaron los primeros ensayos clínicos con Interferón alfa (IFN $\alpha$ ) administrado durante 24 semanas. Con este tratamiento se demostró la negativización de la carga viral al final del tratamiento en dos tercios de los pacientes. No obstante, muchos pacientes recidivaron y solo un 6% obtuvo una respuesta viral sostenida definitiva<sup>87</sup>. Tras el descubrimiento del virus en 1989, la terapia con IFN durante 48 semanas o la asociación con Ribavirina demostraron aumentar la respuesta viral sostenida hasta aproximadamente un 40% de los casos. Además, el desarrollo y comercialización del interferón pegilado representó una mejoría de la posología. A pesar de ello, los efectos secundarios del interferón y la ribavirina llevaron

a una baja tolerabilidad del tratamiento y aceptación por parte de los pacientes y los profesionales médicos <sup>88</sup>.

Tras la descripción del virus en 1989, la investigación se centró en la descripción y caracterización de su genoma, sus principales proteínas y su maquinaria enzimática <sup>89</sup>. El genoma del VHC codifica una poliproteína única de 3010 aminoácidos que se procesa por proteasas virales generando 10 polipéptidos <sup>90</sup>. Tras la descripción de estas potenciales dianas terapéuticas, durante la primera década del siglo XXI, múltiples estudios evidenciaron la efectividad en el bloqueo de estas dianas logrando disminuir la carga viral del VHC <sup>91 92</sup>. En la actualidad, las dianas terapéuticas de los AAD son la proteasa NS3 y su cofactor NS4A, los inhibidores de la fosfoproteinasa NS5A y los inhibidores de la proteasa NS5B.

En 2011 la *Food and Drug administration (FDA)* aprobó el primer AAD para el VHC, el Boceprevir. Este fármaco forma parte de la familia de los inhibidores de la proteasa NS3/4A e interfieren en la maduración de las proteínas virales. Los inhibidores de la fosfoproteinasa NS5A actúan principalmente bloqueando la replicación del ARN y el ensamblaje del virus y los inhibidores de la proteasa NS5B bloquean las zonas catalíticas y no catalíticas de esta enzima interfiriendo en la síntesis del ARN viral <sup>93</sup>. En la Tabla 1 se muestran las principales características de las familias de AAD.

	Tipos	Potencia	Eliminación (principal)	Barrera genética	Efectos secundarios
<b>Inhibidores de la proteasa NS3/4A</b>	Telaprevir* Boceprevir Simeprevir	Baja	Hepática	Baja	++
	Paritaprevir <sup>†</sup> Grazoprevir Glecaprevir Voxilaprevir	Intermedia	Hepática	Alta	+
<b>Inhibidores de la fosfoproteína NS5A</b>	Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir	Elevada	Hepática	Baja	++
	Elbasvir Velpatasvir Pibrentasvir	Elevada	Hepática	Baja	+
<b>Inhibidores de la polimerasa NS5B</b>	<b>Inhibidores no nucleótidos</b> Dasabuvir	Baja	Hepática	Baja	++
	<b>Inhibidores de núcleo(s)tidos</b> Sofosbuvir	Elevada	Renal	Alta	+

\*Telaprevir, Boceprevir y Simeprevir en combinación con interferón pegilado o ribavirina.

† Paritaprevir en combinación con ritonavir

**Tabla 1.** Tipos y características principales de los antivirales de acción directa.

El tratamiento de la infección crónica por VHC se basa en la combinación de al menos dos AAD con diferente mecanismo de acción, con el objetivo de mejorar la eficacia y evitar la aparición de resistencias. La elección y duración del tratamiento están ligadas a la presencia o ausencia de cirrosis, su estadio, los antecedentes de tratamiento y en ocasiones al genotipo. Además, existen contextos epidemiológicos o clínicos que permiten la posibilidad de realizar un tratamiento simplificado sin la necesidad de una determinación genotípica inicial. Actualmente existen cuatro combinaciones de fármacos aprobados en Europa y que se recomiendan en las guías de tratamiento de la *EASL (European Association for the study of the Liver)*<sup>94</sup>. En resumen, Sofosbuvir/Velpatasvir y Glecaprevir/Pibrentasvir son combinaciones pangenotípicas que suelen utilizarse como terapia de elección<sup>95</sup>. Grazoprevir/Elbasvir solo se recomienda para el tratamiento del genotipo 1b y la triple terapia con Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir, a pesar de ser pangentotípica, se reserva para fracasos terapéuticos<sup>96</sup>. No se recomienda el tratamiento con inhibidores de la proteasa NS3/4A en pacientes con cirrosis descompensada por lo que, en estos casos, el tratamiento de elección es el Sofosbuvir/Velpatasvir con ribavirina, alargando el tratamiento hasta 6 meses en casos de efectos secundarios o intolerancia a esta última. La tasa de respuesta viral sostenida a la semana 12 o 24 post-tratamiento marca la efectividad de la terapia. En general, el tratamiento con AAD obtiene una tasa de RVS a la semana 12 superiores al 95%<sup>97</sup>. Existen múltiples factores que juegan un papel en el fracaso del tratamiento como son, la falta de adherencia, las interacciones farmacológicas, concentraciones insuficientes de los fármacos, o las mutaciones asociadas a las resistencias preexistentes o seleccionadas con terapias anteriores<sup>98</sup>.

Tipo de tratamiento	Genotipo	Cirrosis	Antecedentes de tratamiento	Sofosbuvir/ Velpatasvir	Glecaprevir/ Pibrentasvir	Sofosbuvir/ Velpatasvir/ Voxilaprevir	Grazoprevir/ Elbasvir		
Tratamiento simplificado (sin determinación genotípica)	Todos	Sin cirrosis	No	12 semanas	8 semanas	No	No		
			Si						
		Cirrosis compensada (Child-Pugh A)	No		12 semanas				
			Si						
Tratamiento basado en la determinación del genotipo	Genotipo 1a,1b,2,4,5 y 6	Sin cirrosis	No	12 semanas *± ribavirina	8 semanas	No	12 semanas (solo genotipo 1b)		
			Si						
		Cirrosis compensada (Child-Pugh A)	No		12 semanas				
			Si						
	Genotipo 3	Sin cirrosis	No		8 semanas	No	No		
			Si		12 semanas				
		Cirrosis compensada (Child-Pugh A)*	No		8-12 semanas				
			Si		16 semanas	12 semanas			

**Tabla 2.** Combinaciones de antivirales de acción directa disponibles e indicaciones terapéuticas.

El tratamiento del VHC con AAD es altamente efectivo en poblaciones de riesgo o en pacientes con comorbilidades como la ERC o la infección por VIH. Las tasas de respuesta viral sostenida son superiores al 95% <sup>99</sup>. En los casos de coinfección con VIH hay que seleccionar adecuadamente el tratamiento debido al riesgo de interacciones farmacológicas, especialmente con los inhibidores de proteasa y algunos análogos no nucleósidos de la transcriptasa inversa <sup>100</sup>. El tratamiento con AAD en los pacientes con ERC ha evolucionado más lentamente que en otros grupos de pacientes. Esto es debido a varios motivos entre los que destacan la exclusión de estos pacientes en los ensayos clínicos iniciales y el poco conocimiento de la farmacocinética y farmacodinámica de estos fármacos especialmente en pacientes con ERC avanzada o terminal <sup>101</sup>. Además, el metabolito principal del Sofosbuvir, se elimina principalmente por vía renal y su uso en los pacientes con ERC avanzada ha estado en discusión. Por ello, inicialmente, los pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada fueron tratados con regímenes libres de Sofosbuvir. Los resultados de los estudios RUBY-1 <sup>102</sup> y Vie-KinD <sup>103</sup> demostraron una alta seguridad y tolerabilidad de Ombitasvir/Paritaprevir/ritonavir ± Dasabuvir ± Ribavirina en pacientes con ERC estadio 4-5 o que estaban bajo terapia renal sustitutiva (TRS). La tasa de RVS en la semana 12 fue del 90 y 93% respectivamente. Otros ensayos clínicos como el C-SURFER (Grazoprevir/Elbasvir) <sup>104</sup> o el EXPEDITION-4 (Glecaprevir/Pibrentasvir) <sup>105</sup> evidenciaron tasas de RVS del 98% en pacientes con ERC

terminal y confirmaron la seguridad y tolerabilidad de otros AAD para el tratamiento de este grupo de pacientes. Hasta hace unos tres años, el uso de Sofosbuvir en la insuficiencia renal avanzada ( $<30\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ ) no estaba recomendado, y su uso debía ser valorado solo en casos en los que no existiera otra opción terapéutica <sup>106 107</sup>. Actualmente, existe suficiente evidencia que respalda el uso de pautas con Sofosbuvir independientemente del estadio de ERC <sup>108109</sup>.

#### **1.4.6. Impacto del tratamiento con AAD**

El tratamiento con AAD ha modificado radicalmente la historia natural de la infección crónica por VHC. A nivel hepático, la curación del VHC ha demostrado reducir la mortalidad, la progresión de la fibrosis, el riesgo de descompensación hepática y el desarrollo de CHC. Resultados del seguimiento de una cohorte de 1760 pacientes (49.4% cirróticos) con VHC tratados con AAD mostró una incidencia acumulada de progresión de la enfermedad (descompensación hepática, trasplante hepático, CHC de novo o muerte) del 4.1% tras una mediana de seguimiento de más de 2 años. Las variables asociadas a esta progresión fueron la fibrosis avanzada, la hipertensión portal clínicamente significativa y la presencia de una albúmina sérica  $<3.5\text{mg/dl}$  previa al inicio del tratamiento <sup>110</sup>. Además, se describió que la respuesta viral sostenida redujo el riesgo de descompensación hepática y CHC de novo en toda la cohorte. De forma similar, el seguimiento de una cohorte de 868 pacientes cirróticos por VHC (83% Child-Pugh A) mostró un riesgo reducido de progresión clínica únicamente en aquellos pacientes Child-Pugh A <sup>111</sup>. Estos resultados están en consonancia con la ausencia de mejoría de la función hepática observada tras una mediana de seguimiento de 4 años en una cohorte de 642 pacientes con cirrosis descompensada o avanzada (91% RVS) <sup>112</sup>. Otra forma interesante para medir el impacto del tratamiento a nivel hepático es evaluar los pacientes con VHC tratados y en lista de trasplante hepático. El seguimiento de 238 pacientes de estas características reportó una retirada de la lista de trasplante de un 24% de los 122 pacientes con cirrosis descompensada sin CHC <sup>113</sup>. Ante estos datos, se interpretó que la gran mayoría de pacientes con infección por VHC obtendrían un beneficio clínico y de supervivencia con el tratamiento. A pesar de ello, no existen dudas de que el beneficio es mayor en pacientes sin enfermedad hepática establecida o con fibrosis incipiente <sup>114</sup>. Además, estos datos apoyan la necesidad de realizar seguimiento

clínico y despistaje de CHC tras la curación del VHC en aquellos pacientes con fibrosis avanzada previa al tratamiento antiviral.

De forma similar, múltiples estudios han demostrado una mejoría o ausencia de progresión de las manifestaciones extrahepáticas tras la curación del VHC. Se ha descrito una reducción de la fatiga, una mejoría de la calidad de vida, una disminución del riesgo de linfoma, de eventos cardiovasculares y de diabetes mellitus tipo 2 <sup>75</sup>. A nivel renal, un estudio prospectivo que incluyó 148 pacientes con vasculitis crioglobulinémica describió una respuesta clínica completa en el 76% de estos tras la curación del VHC <sup>115</sup>. Resultados de seguimiento de 52 pacientes con glomerulonefritis crioglobulinémica mostraron tasas de RVS muy altas (94%) con más de un 60% de remisión completa o parcial de la enfermedad renal <sup>116</sup>. En la actualidad, existen pocos datos del impacto de la curación del VHC en la evolución de la función renal en pacientes con ERC. El seguimiento a un año de 523 pacientes con ERC y VHC que se trajeron con AAD no observó diferencias significativas en la TFG<sub>e</sub> comparado con una cohorte histórica de pacientes no tratados <sup>117</sup>. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el seguimiento de 403 pacientes con ERC y VHC en los que sí que se describió un aumento significativo de la TFG<sub>e</sub> 12 semanas después del tratamiento <sup>118</sup> si bien en esta última cohorte solo 6 pacientes presentaban ERC estadio 4 o 5. Resultados de seguimiento de dos grandes cohortes de pacientes tratados con regímenes basados en interferón describieron una disminución del riesgo de glomerulonefritis entre los pacientes con RVS y un menor riesgo de ERC terminal entre los que recibieron tratamiento <sup>119 120</sup>. Este último resultado es similar a los encontrados en una revisión retrospectiva de 245,596 pacientes con VHC de los cuales 40,654 recibieron tratamiento con AAD. En esta revisión, la incidencia de enfermedad renal crónica fue menor entre aquellos que recibieron terapia antiviral. Además, en el análisis multivariado, el tratamiento con AAD se asoció de forma independiente con una disminución significativa del riesgo de complicaciones hepáticas, no hepáticas y de mortalidad. <sup>121</sup>. Ante estos datos, parece indudable que las altas tasas de curación del VHC conseguidas con los AAD tienen un claro impacto en la morbilidad y mortalidad asociadas a esta infección.

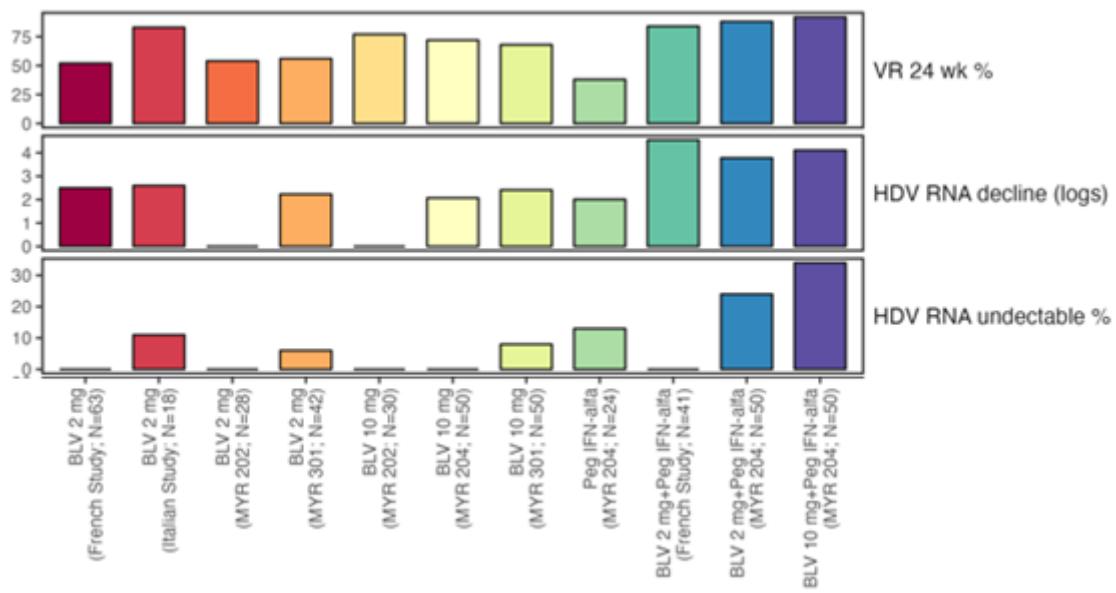
## 1.5. Virus de la hepatitis D

**El virus de la hepatitis D (VHD)** es un virus ARN defectivo perteneciente a la familia *Deltaviridae*. Tiene un genoma de ARN monocatenario circular de polaridad negativa de tan solo 1.7 kb, con un ciclo viral y características estructurales análogas a los viroides que infectan plantas. Este genoma tan solo tiene una región codificante para un antígeno propio (HDAg) y no codifica ninguna polimerasa viral, por lo que la replicación depende de la polimerasa ARN del huésped. Mediante la acción de otra enzima celular, la adenosina deaminasa, que actúa sobre ARN (ADAR1), el genoma del virus es editado modificando el codón de “STOP” del HDAg lo que permite codificar un antígeno corto y otro más largo. Estos dos antígenos, conocidos como “antígeno corto (sHDAg)” y “antígeno largo (lHDAg)”, son esenciales en el ciclo viral y forman parte de la partícula viral que estará envuelta por el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) del VHB<sup>122</sup>. Además, el VHD utiliza el HBsAg para ingresar en los hepatocitos y luego diseminarse. Por todo ello, la infección por VHD únicamente puede estar presente en pacientes con infección por VHB. La infección por VHB se detalla en el apartado 1.3. La infección aguda por VHD puede ocurrir de forma simultánea al VHB (coinfección) o de forma diferida en pacientes previamente infectados por VHB (superinfección)<sup>123</sup>.

A pesar de que existen regiones en las que se desconoce de la epidemiología del VHD, se estima que esta infección está presente en aproximadamente un 4.5% de los individuos infectados por el VHB, lo que representa unos 10 o 20 millones de personas en todo el mundo.<sup>124</sup> Las vías de transmisión son las mismas que para la hepatitis B, siendo la vía parenteral la predominante. La infección crónica por hepatitis D se considera la forma más grave de hepatitis viral. Los pacientes con hepatitis crónica delta presentan una mayor severidad de la enfermedad hepática, con un más rápido desarrollo de cirrosis, mayor riesgo de descompensación hepática y una mayor mortalidad en comparación con los pacientes que presentan monoinfección por VHB<sup>125</sup>. El diagnóstico está basado en la serología mediante la detección de anticuerpos frente al VHD (anti-VHD) y la determinación de la carga viral (ARN-VHD). El ciclo de replicación del VHD no se ve afectado por las terapias antivirales convencionales contra el VHB, como los inhibidores de la polimerasa viral que se usan en la infección por el VHB. Durante mucho tiempo, el tratamiento con interferón- $\alpha$  pegilado (pegIFNa) ha sido la única opción terapéutica disponible a pesar de las bajas tasas de respuesta (20-30%) y la mala

tolerancia al tratamiento <sup>126</sup> Además, una gran proporción de los pacientes que responden inicialmente, recurren, incluso varios años después de finalizar el tratamiento, lo que conlleva la necesidad de una evaluación repetitiva a largo plazo de la carga viral del ARN del VHD. Recientemente se han identificado nuevas dianas moleculares que han derivado en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra el VHD. Algunos compuestos como Bulevirtide (BLV) en monoterapia o combinados con pegIFNa se han evaluado en ensayos clínicos. El BLV es un inhibidor de la entrada de péptidos que bloquea la unión de las partículas envueltas de HBsAg al polipéptido transportador NTCP (Taurocolato de sodio), receptor de entrada para el VHB y VHD. De esta manera BLV evita la entrada del VHD en los hepatocitos. A raíz de los potenciales efectos terapéuticos favorables y la buena tolerabilidad del BLV comprobados en ensayos de fase II, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó de forma condicional el BLV en 2020 para el tratamiento de adultos con enfermedad hepática crónica compensada.

Esta terapia ha marcado un punto de inflexión en el tratamiento de la infección por VHD <sup>127 128</sup>. Estudios recientes han reportado tasas de respuesta virológica del 50% a pesar del corto período de seguimiento. Estos resultados coinciden con los de una revisión reciente en la que se han analizado los diferentes estudios existentes con BLV en monoterapia o en combinación con IFN. Valorando la respuesta virológica como una disminución de 2 logaritmos de la carga viral y administrando una dosis de 2mg/día, la respuesta virológica ha sido del 54% en monoterapia y del 75% en combinación con IFN<sup>129</sup>. Por último, datos de un reciente estudio fase 3 han mostrado una disminución de 2 logaritmos de la carga viral en un 48% de los pacientes a las 48 semanas de tratamiento. Sin embargo, la negativización de la viremia a las 48 semanas solo se ha descrito en un 20% de los pacientes tratados <sup>130</sup>.



**Figura 6.** Respuesta a Bulevirtide durante 24 semanas en diferentes estudios. Monoterapia vs combinación con IFNpeg. Imagen extraída de Lampertico et al., 2022.

## 1.6. Virus de la hepatitis E

El **virus de la hepatitis E (VHE)** es un virus ARN monocatenario de 7.2 kb perteneciente a la familia *Hepeviridae* con cuatro genotipos mayoritarios (1 a 4) bien caracterizados y otros cuatro (5 a 8) minoritarios y todavía no bien tipificados. Actualmente se considera la causa más frecuente de hepatitis aguda a nivel mundial. Su forma de transmisión viene determinada por el genotipo predominante en cada región. En los países de baja renta, los genotipos predominantes son el 1 y 2, cuya transmisión se produce por vía fecal-oral. Se han estimado más de 20 millones de casos anuales en 9 regiones de África y Asia <sup>131</sup>. En cambio, en países de alta renta, donde predominan los genotipos 3 y 4, la infección es considerada una zoonosis transmitida al ingerir o manipular carne poco cocinada o cruda de cerdo, jabalí, ciervo, así como otros productos contaminados. El genotipo 7 también se ha relacionado con este tipo de transmisión. El VHE es la única hepatitis viral que tiene reservorio animal y que por tanto puede ser transmitida de éstos a humanos. La transmisión por hemoderivados también está muy bien caracterizada en el genotipo 3 y su cribaje sistemático en bancos de sangre se está extendiendo <sup>132</sup>. Las dos vías de transmisión por consumo de alimentos contaminados y por hemoderivados se ilustran en el estudio de Riveiro et al <sup>133</sup> en el que se describe un caso clínico de

infección por transfusión de hemoderivados a partir de un donante que se infectó por vía zoonótica. En la mayoría de casos, la hepatitis E es una enfermedad asintomática y autolimitada. No obstante, existen grupos de riesgo para desarrollar enfermedad grave como son las gestantes o los pacientes cirróticos. En el caso de las gestantes, se han descrito tasas de letalidad del 20 al 40% <sup>134</sup>. En los pacientes cirróticos, la infección aguda por VHE puede desencadenar un fallo hepático agudo sobre crónico, asociando mayor mortalidad <sup>135</sup>. Además de las manifestaciones hepáticas, se han descrito múltiples manifestaciones extrahepáticas, principalmente neurológicas, como polineuropatía desmielinizante, ataxia o aplasia medular. El diagnóstico se basa en la serología mediante anticuerpos anti-VHE (IgM o IgG) y la determinación de la carga viral (ARN-VHE). A pesar de que no es habitual, los pacientes inmunosuprimidos, en especial los receptores de un trasplante de órgano sólido, pueden experimentar una persistencia o cronificación de la infección que se asocia a una rápida progresión de la fibrosis y desarrollo de cirrosis <sup>136</sup>. Los casos crónicos están definidos por la persistencia del ARN-VHE durante más de tres meses. El tratamiento de la hepatitis E se realiza con Ribavirina, la cual se reserva para los casos graves y crónicos <sup>137</sup>. La prevención de la infección se basa en las medidas higiénico-dietéticas, en el control y medidas de seguridad del consumo cárnico y en el correcto cribaje de hemoderivados. Además, recientemente se ha aprobado una vacuna que hasta el momento solo está recomendada para el control de brotes epidémicos de la infección <sup>138</sup>.

## **1.7. Nuevas herramientas diagnósticas para las hepatitis virales crónicas**

Históricamente el diagnóstico microbiológico ha estado ligado al Hospital y a la presencia de un laboratorio donde se utilizan técnicas de inmunoensayos de altísima sensibilidad y especificidad, y que actualmente se basan de manera predominante en la quimioluminiscencia. A pesar de disponer de estas técnicas, el acceso a ellas es muy limitado en regiones con altas prevalencias de infección por hepatitis virales crónicas. Por suerte, en los últimos años se han desarrollado y/o perfeccionado técnicas diagnósticas que permiten descentralizar el diagnóstico del laboratorio, obtener resultados inmediatos o en muy poco tiempo y que facilitan el acceso al diagnóstico en regiones con escasos recursos o poblaciones poco accesibles <sup>46</sup>. Un buen ejemplo de ello son las pruebas serológicas rápidas para el diagnóstico de la hepatitis C y B que

pueden utilizarse con fines de cribado y que están basadas en la inmunoensayo. En general, ofrecen sensibilidades y especificidades por encima del 90%, aunque la sensibilidad puede variar sustancialmente dependiendo del fabricante y disminuir en casos con baja carga antigenica<sup>139 140</sup>. A pesar de su inferior sensibilidad y/o especificidad, pueden facilitar el diagnóstico en estas regiones remotas, así como en grupos de riesgo mal vinculados a los sistemas sanitarios habituales.

Por otro lado, la rapidez y acceso al diagnóstico molecular ha mejorado significativamente con los formatos “point-of-care” como el GenXpert (Cepheid®, California, USA). Esta tecnología aporta una alta precisión en el diagnóstico, fácil manipulación de las muestras y rapidez en los resultados<sup>141 142</sup>. Esta prueba no solo se usa en hospitales de países de alta renta para obtener un diagnóstico precoz, sino que también ha permitido llevar el diagnóstico molecular hasta regiones de bajos recursos. El principal problema de estas pruebas es el precio elevado que limita su universalización a corto plazo.

Las muestras de sangre seca (sangre fijada sobre un soporte sólido) han demostrado ser una herramienta alternativa para el diagnóstico serológico y virológico de enfermedades infecciosas como el VIH<sup>143</sup>. Es una técnica sencilla que permite la recogida y almacenaje de muestras de sangre capilar o venosa en un papel secante y su posterior recuperación en el laboratorio para su análisis habitual. Estas herramientas permiten realizar la toma de muestras de forma sencilla, con escaso material y en cualquier entorno, permitiendo descentralizar el diagnóstico. Existe una creciente evidencia de la utilidad y validez de esta técnica para el diagnóstico de las hepatitis virales crónicas. Datos de un metaanálisis reciente mostró una sensibilidad y especificidad agrupadas para la técnica de sangre seca frente al procesamiento habitual del 98% y 100% respectivamente para la determinación del HBsAg y del 98 y 99% respectivamente para los anticuerpos anti-VHC<sup>144</sup>.

Por el contrario, la sensibilidad para la detección de las cargas virales del VHB y el VHC en muestras de sangre seca se ha mostrado menor, en especial para el ADN VHB debido al efecto de dilución al recuperar la muestra y el consecuente aumento de los límites de detección. No obstante, existe una fuerte correlación entre los resultados moleculares de las muestras de sangre seca y las procesadas por medios habituales de plasma

(Soulier et al., 2016; Jardiet al., 2004; Mohamed et al., 2013). La detección de anticuerpos anti-VHD y ARN-VHD en muestras de sangre seca también ha mostrado buenos resultados (Jackson et al., 2019). Las principales limitaciones de las muestras de sangre seca son la menor sensibilidad para detectar cargas virales y la variabilidad asociada al papel utilizado y poca estandarización del volumen de sangre recogido. Recientemente se han desarrollado las tarjetas de separación de plasma (TSP) (Roche®) con algunas características para mejorar el diagnóstico en comparación con otros papeles secantes motivo por el que se han utilizado en la presente tesis doctoral. Estas tarjetas incorporan un filtro que separa las células sanguíneas del plasma minimizando la interferencia del material celular en la muestra, un estabilizador de ácidos nucleicos y una mayor capacidad de volumen (140µL) en cada uno de los tres círculos de papel (Carmona et al., 2019). No obstante su precio es mayor que el papel secante convencional <sup>145</sup>. Los primeros estudios que se realizaron con muestras de sangre seca recogidas en TSP obtuvieron una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico molecular del VIH y del VHC (Carmona et al., 2019; Marins et al., 2020).

## 1.8. Estrategias de cribado para la infección por VHC y VHB

Dada la gran carga de morbilidad y mortalidad de las hepatitis virales y en vista de los nuevos tratamientos para la hepatitis C, la disponibilidad de medidas preventivas para la infección por el VHB y el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, en 2016, se lanzó la primera estrategia mundial para la eliminación de las hepatitis virales. Los objetivos marcados por la OMS fueron la reducción en un 65% de la mortalidad relacionada con las hepatitis y en un 90% las nuevas infecciones para el año 2030 <sup>46</sup>.

Incrementar el diagnóstico de las hepatitis virales es uno de los principales pilares para alcanzar las metas de eliminación. Para ello, el cribado de ambas infecciones es crucial. Un buen ejemplo es el rastreo sistemático implementado en los bancos de sangre y disminución de la transmisión nosocomial que han tenido un gran impacto en la disminución de la incidencia de nuevos casos de hepatitis C y B en nuestro medio. Esta fotografía contrasta con lo que sucede en muchos países de baja y media renta. En África sub-Sahariana, por ejemplo, el cribado sistemático en los bancos de sangre no se realiza de manera óptima. La escasez de pruebas diagnósticas, las frecuentes roturas de stock y el uso exclusivo de pruebas serológicas rápidas favorecen la inseguridad en estas

prácticas <sup>146</sup>. Por si fuera poco, más de un 50% de las transfusiones de hemoderivados van dirigidas a niños menores de 5 años, aumentando el riesgo de cronificación de la hepatitis B en caso de transmisión nosocomial <sup>147</sup>.

En nuestro medio, la amplia cobertura vacunal frente al VHB, las mejoras en las medidas preventivas para evitar la transmisión de ambas hepatitis y los nuevos tratamientos con antivirales de acción directa para el VHB han hecho que, tanto la hepatitis C y B queden prácticamente relegadas a grupos de riesgo bien definidos como son los UDVP, personas que viven con VIH, inmigrantes de zonas endémicas o colectivos con prácticas sexuales de riesgo. Por ello, y con el afán de cumplir con los objetivos de 2030, el cribado activo de poblaciones de riesgo se está expandiendo y los proyectos de microeliminación del VHC se están multiplicando <sup>148</sup>.

La recuperación de pacientes perdidos del sistema sanitario es una de las estrategias que se ha utilizado para la eliminación del VHC. En la provincia de Utrecht se realizó un estudio de microeliminación recuperando pacientes a través de los resultados positivos (anti-VHC o ARN-VHC) del laboratorio de 5 centros de salud. Tras revisar las historias y contactar con los pacientes, se re-identificaron 42 infecciones crónicas a las que se les ofreció tratamiento con AAD <sup>149</sup>. Otros proyectos de microeliminación del VHC en centros psiquiátricos o penitenciarios <sup>150</sup> han resultado útiles para aumentar el diagnóstico y tratamiento. No obstante, estos proyectos pierden efectividad cuando se trata de la microeliminación en grupos que mantienen actividades de riesgo para la reinfección por VHC. En este sentido, resultados de seguimiento a un año de UDVP activos a los que se les testó y ofreció tratamiento con AAD, observó que a pesar de su impacto, las tasas de aceptación del cribado y cumplimiento del tratamiento fueron bajas, describiendo además, un mayor fracaso del tratamiento y reinfecciones <sup>151</sup>. Asimismo, el cribado sistemático de VHB y VHC en población inmigrante y su vinculación al sistema sanitario ha demostrado ser coste-efectivo y necesario para eliminar ambas infecciones en Europa <sup>152</sup>.

A pesar de que en la última década se han logrado grandes avances en la eliminación de las hepatitis virales, la disminución de la prestación de servicios de salud durante la pandemia por COVID-19 ha llevado a reducciones en el diagnóstico, tratamiento y atención de los pacientes con hepatitis virales crónicas <sup>153</sup>. Este impacto negativo

sumado a la desigualdad en el acceso al diagnóstico y tratamiento a nivel global hacen poco probable alcanzar los objetivos marcados para 2030.

## 2. Hipótesis de la tesis doctoral

La eliminación de las hepatitis virales es un reto de salud pública a nivel mundial. Sin embargo, los casos diagnosticados y tratados en la actualidad son subóptimos a pesar de que el tratamiento del VHC con los antivirales de acción directa disminuye las complicaciones y la mortalidad a largo plazo y la vacunación del VHB puede prevenir la infección en la mayoría de casos.

La aplicación de nuevas herramientas o estrategias diagnósticas como las muestras de sangre seca para el VHB, VHC y VHD podrían facilitar el diagnóstico en la comunidad o en países con bajos recursos. Hasta la fecha las estrategias de microeliminación del VHC en nuestro medio están enfocadas a grupos de alto riesgo como los UDVP o personas privadas de libertad. Estrategias para la recuperación de pacientes no tratados y perdidos en el seguimiento podrían contribuir a la eliminación del VHC. Por último, el tratamiento del VHC con AAD en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada podría tener un impacto positivo a largo plazo sobre la función renal al igual que sucede con la enfermedad hepática u otras complicaciones extrahepáticas.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo primario**

Evaluar el impacto a largo plazo del tratamiento con antivirales de acción directa, analizar la precisión de nuevas herramientas diagnósticas para las hepatitis virales crónicas y analizar el impacto de nuevas estrategias para incrementar el diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C.

### **3.2. Objetivos secundarios**

- Evaluar la mortalidad y la evolución de la función hepática y renal a largo plazo en pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada e infección por VHC tratados con antivirales de acción directa.
- Evaluar la validez de las muestras de sangre seca almacenadas en tarjetas de separación de plasma para el diagnóstico serológico y virológico de las hepatitis B, C y D.
- Implementar una estrategia de recuperación de pacientes con infección crónica por VHC perdidos en el seguimiento, evaluar su coste-efectividad y analizar el impacto de la pandemia por COVID-19 sobre la pérdida de seguimiento de pacientes.

## 4. Material y métodos

Este proyecto de tesis doctoral incluye tres estudios:

### 4.1. Seguimiento a largo plazo de pacientes infectados por el VHC con enfermedad renal crónica en estadio terminal tras una respuesta virológica sostenida con antivirales de acción directa

El primer trabajo es un estudio retrospectivo-prospectivo multicéntrico en el que participaron pacientes monoinfectados por el VHC (genotipos 1 o 4) y/o coinfectados por VIH, que además presentaban enfermedad renal crónica avanzada (estadio 3b-5) y que habían participado previamente en el estudio VieKinD (evaluación de la efectividad del tratamiento con Ombitasvir/Paritaprevir ritonavir ± Dasabuvir (OBV/PTV/r ± DSV) durante 12-24 semanas). Los pacientes recibieron tratamiento entre enero y diciembre de 2015.

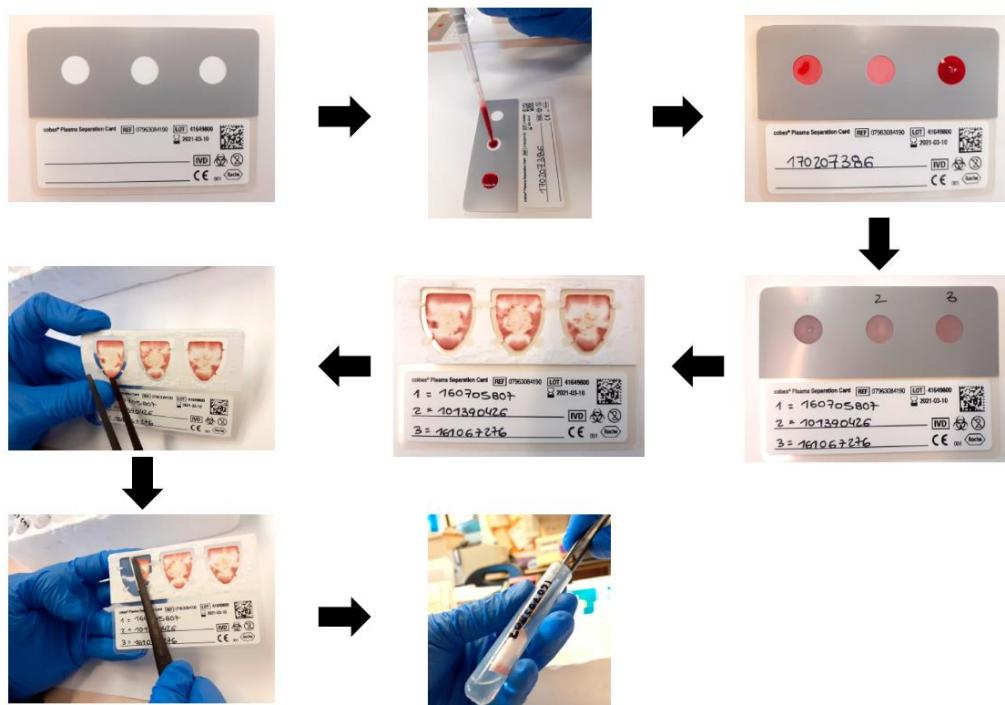
Los datos iniciales y de respuesta viral sostenida a la semana 12 (RVS12) se recuperaron de la base de datos del estudio VieKinD. Los datos de seguimiento se obtuvieron mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes hasta diciembre de 2020. Se revisaron datos clínicos como hipertensión, diabetes, estadio de la ERC, necesidad de TRS, trasplante renal, presencia de cirrosis, episodios de descompensación hepática (ascitis, hemorragia digestiva por hipertensión portal y encefalopatía), CHC y causa de la muerte, además de parámetros analíticos y determinaciones del ARN del VHC. La parte prospectiva del estudio se centró en los pacientes que estaban vivos, disponibles y accesibles para el seguimiento. Se contactó con ellos para realizarles una visita médica y una analítica (hemograma, AST, albúmina, bilirrubina, creatinina, TFGe y ARN-VHC) y una ET hepática. Para comparar las tasas de mortalidad de nuestra cohorte, se utilizó una cohorte histórica de individuos infectados por el VHC bajo TRS de la Organización Catalana de Trasplantes (OCATT) con datos recogidos del 2000 al 2015, justo antes de la amplia disponibilidad de los nuevos AAD. La tasa de mortalidad de nuestra cohorte se comparó con los datos de la cohorte del OCATT teniendo en cuenta la mediana de seguimiento de nuestros pacientes. La TFGe se calculó basándose en la ecuación CKD-EPI. El estadio de la ERC se definió según las últimas guías de KDIGO: grado 1  $\geq 90$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, grado 2  $\geq 60-89$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, grado 3a  $\geq 45-59$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, grado 3b  $\geq 30-44$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, grado 4  $\geq 15-29$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> y grado 5  $< 15$  ml/min/1,73m<sup>2</sup><sup>154</sup>. La evaluación de la fibrosis hepática se realizó mediante la ET hepática (F4  $\geq 12,5$

kPa, F3  $\geq$  9,5, F2  $\geq$  7, y F0-F1  $<$  7 kPa). El ARN del VHC se determinó mediante el sistema automatizado de PCR en tiempo real (Cobas 6800, Roche). Las causas de muerte se clasificaron en seis grupos (cardiovascular, oncológica, infecciosa, enfermedad renal, enfermedad hepática y otras).

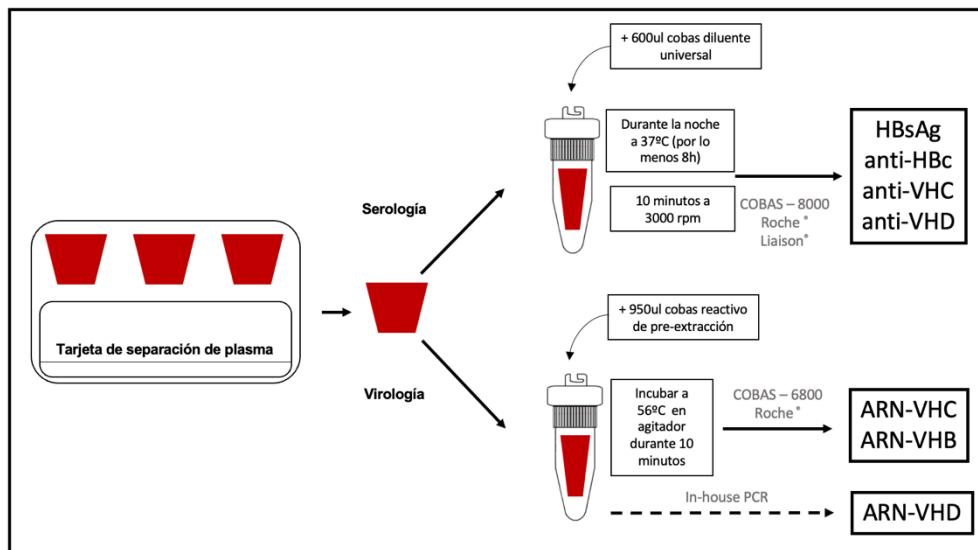
#### **4.2. Validación y estandarización del diagnóstico serológico y molecular de Hepatitis C y B en muestras de sangre seca mediante tarjetas de separación de plasma**

El segundo trabajo fue un estudio prospectivo y observacional que tenía como objetivo la validación de las muestras de sangre seca obtenidas por medio de tarjetas de separación de plasma (TSP) (Roche, Cobas® Plasma Separation Card, Pleaseanton, CA). El estudio de validación se realizó en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona (España) y fue seguido de un estudio piloto de implementación en el Hospital Nossa Senhora da Paz en Cubal, Angola. Este hospital está situado en el municipio rural de Cubal, provincia de Benguela. En este centro, únicamente se puede realizar diagnóstico serológico de VHB y VHC mediante test rápidos y ningún hospital público de la provincia dispone de diagnóstico molecular de ambas infecciones.

Para el estudio prospectivo y observacional, se seleccionaron pacientes no consecutivos de la consulta externa del servicio de Hepatología del Hospital Vall d'Hebron de octubre a diciembre de 2019. Se incluyeron pacientes con anticuerpos anti-VHC positivos independientemente de la presencia de ARN del VHC, pacientes HBsAg positivos y un pequeño número de pacientes con anticuerpos anti-VHD. Se recogieron simultáneamente dos muestras de sangre de cada paciente, una muestra de sangre venosa que se recogió en un tubo con EDTA y que se procesó de forma convencional y una muestra de sangre capilar que se almacenó en una tarjeta de separación de plasma (TSP) y que se procesó tal y como se muestra en la figura 7a <sup>155</sup> y 7b.



**Figura 7a.** Muestreo en TSP y extracción de la muestra de sangre seca para recuperación del plasma. Imagen extraída de Velásquez-Orozco et al., 2021.



**Figura 7b.** Procesamiento para la realización del análisis serológico y virológico en la muestra de sangre seca.

La sangre capilar se colocó en cada uno de los 3 círculos de papel secante que contiene una TSP completa. La tarjeta se dejó secar durante al menos 4 días a temperatura ambiente. A continuación, se extrajeron cada una de las tres manchas de sangre seca de la TSP utilizando unas pinzas y se procesó siguiendo el protocolo establecido. Para la realización de las serologías se utilizó un sistema electroquimioluminiscente automatizado (módulos cobas e601/cobas e602 o cobas e801 de la serie de analizadores modulares cobas® 8000, Roche, Basilea, Suiza) para el HBsAg (Elecsys HBsAg II), los anticuerpos anti-HBc (Elecsys anti-HBc II) y anti-VHC (Elecsys anti-VHC II) en muestras convencionales y el plasma obtenido de las TSP. En los casos HBsAg positivos, se determinaron los anticuerpos anti-VHD utilizando el ensayo anti-VHD LIAISON XL murex en un sistema automatizado de quimioluminiscencia (Liaison®, DiaSorin) en muestras de suero y en los respectivos eluidos de las TSP. Todos los marcadores serológicos se realizaron con el eluido de 1 círculo o mancha de sangre seca de la TSP (140 µl). Para la obtención del plasma de la TSP, se extrajo un círculo de la TSP y se incubó a 37 °C con 600 µL de diluyente (diluyente universal Elecsys) durante toda la noche (al menos 8 h).

Si las pruebas de HBsAg, anti-HCV o anti-HDV resultaban positivas, se realizaba una prueba molecular (ADN-VHB, ARN-VHC, ARN-VHD) de forma refleja en una segunda mancha de TSP. Para la realización del análisis molecular se utilizó un sistema automatizado de PCR en tiempo real (Cobas 6800®, Roche, Basilea, Suiza) para medir el ADN-VHB (Cobas VHB®) y el ARN-VHC (Cobas VHC®) en muestras de plasma y en las respectivas muestras de sangre seca. Para el estudio de la carga viral del ARN VHD se utilizó un sistema de PCR a tiempo real “in house” desarrollado por el propio laboratorio del Vall d’Hebron previamente descrito en el sistema Light Cycler V2 <sup>156</sup>

Para extraer el ARN/ADN de la TSP, se recuperó el plasma de 1 círculo de la TSP para cada determinación de carga viral para tener suficiente volumen. Las muestras se incubaron a 56 °C con 950 µL de reactivo de preextracción de muestras (Roche®, Basilea, Suiza) durante 10 minutos a 1000 rpm en un termoagitador precalentado. Todas las muestras para el estudio de VHB y VHC se cargaron en el sistema Cobas 6800® para la extracción, amplificación y detección del ARN/ADN de acuerdo con las instrucciones de procesamiento con un volumen de 500 µL. En las figuras 7a y 7b se

muestra el procesamiento de la sangre en TSP para el análisis serológico y virológico de VHC, VHB y VHD.

Durante el mes de diciembre de 2019, realizamos un muestreo aleatorio en el Hospital Nossa Senhora da Paz en Cubal (Angola), seleccionando adultos no consecutivos mayores de 18 años de las consultas externas del hospital. Tras firmar el consentimiento informado, se registraron datos demográficos, clínicos y epidemiológicos. Se realizó un hemograma y una determinación de AST y ALT en el laboratorio del hospital de Cubal. Se recogió sangre capilar para llenar una tarjeta de separación de plasma completa, se dejó secar durante al menos 4 días a temperatura ambiente y se envió por correo ordinario al laboratorio clínico del Hospital Vall d'Hebron donde se realizó el procesamiento de las muestras de sangre seca tal y como se ha descrito previamente. Todas las muestras almacenadas en TSP se procesaron en las tres semanas siguientes a su recogida.

#### **4.3. Análisis de coste-efectividad de la estrategia ReLink-C para recuperar pacientes con infección por VHC perdidos en el seguimiento e impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida de seguimiento y recuperación de pacientes**

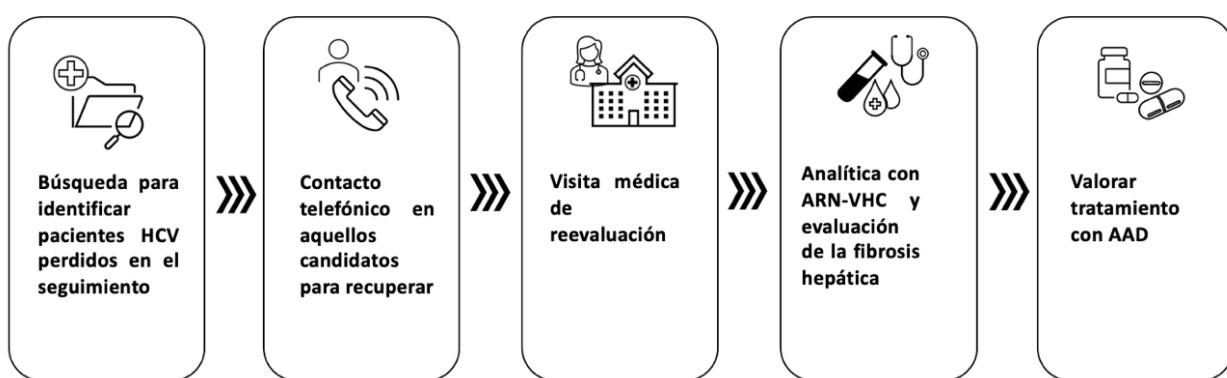
El tercer trabajo tuvo como objetivo aplicar una estrategia para recuperar pacientes con infección crónica por VHC no tratados y que habían sido perdidos en el seguimiento. La recuperación de estos pacientes se hizo inicialmente a través de los datos de las cargas virales positivas para VHC detectadas en el laboratorio del Hospital Vall d'Hebron. Desde 2019, se realizan cargas reflejas en caso de resultados positivos para anti-VHC sin necesidad de que el clínico solicite la carga viral <sup>157</sup>. Por ello, la recuperación de pacientes se realizó a partir de 2019 hasta 2021.

Este trabajo es un estudio ambispectivo basado en la estrategia ReLink-C que constó de una primera fase centrada en la identificación de los casos positivos para el ARN-VHC a través de los registros de cargas virales reflejas realizadas en el laboratorio del Hospital Vall d'Hebron y en la revisión de las historias clínicas y una parte prospectiva para la recuperación de los pacientes no tratados y perdidos en el seguimiento. La revisión de las historias clínicas se centró en determinar si el paciente había recibido tratamiento para el VHC con los nuevos AAD, así como los motivos por los cuales no se había

realizado. Para la recuperación de pacientes se excluyeron todos aquellos que realmente ya habían recibido tratamiento los que presentaban contraindicaciones para el tratamiento, comorbilidades limitantes o corta expectativa de vida, los fallecidos y aquellos en los que no se disponía de información para contactar.

La segunda fase de la intervención se centró en las personas que no habían recibido tratamiento. Se llamó un máximo de cinco veces a los números de contacto encontrados en la historia clínica, y en los casos en los que no se obtuvo respuesta, se les envió una cita por correo ordinario. Aquellos pacientes contactados con éxito fueron informados del objetivo del proyecto de recuperación ReLink-C e informados de la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con AAD. Finalmente, se ofreció y agendó una visita presencial en el Hospital para valorar inicio de tratamiento para el VHC. En una única visita se realizó una nueva historia clínica y exploración física, una extracción sanguínea que incluyó hemograma, AST, ALT, creatinina, TFG e ARN-VHC y genotipo viral en los casos positivos, así como una ET hepática para determinar el grado de fibrosis hepática ( $F4 \geq 12,5 \text{ kPa}$ ,  $F3 \geq 9,5$ ,  $F2 \geq 7$ , y  $F0-F1 < 7 \text{ kPa}$ ). A los pacientes con fibrosis hepática avanzada ( $F3-F4$ ) se les realizó una ecografía abdominal. Tras evaluar todos los resultados y confirmar la presencia de una infección activa (ARN-VHC detectable), se contactó nuevamente con el paciente y se ofreció tratamiento con AAD evaluando cumplimiento y curación posterior. En la figura 8 se resumen las fases de la estrategia ReLink-C.

**Figura 8.** Resumen de las fases de la estrategia ReLink-C



Además, se realizó una evaluación económica para estimar la coste-efectividad de la estrategia ReLink-C en comparación con la ausencia de intervención activa. Los costes de la estrategia ReLink-C incluyeron los recursos sanitarios utilizados para el diagnóstico

del VHC (horas asignadas a la búsqueda de los pacientes perdidos y la evaluación médica) y la vinculación al sistema sanitario excluyendo los costes de tratamiento con los AAD. El impacto en los resultados sanitarios y económicos de ReLink-C frente a la no intervención se estimó utilizando un modelo de Markov previamente descrito para simular la evolución natural de la hepatitis C crónica a través de diferentes estados de salud a lo largo de la vida del paciente <sup>158</sup>. Este modelo incluyó solo el coste sanitario directo asociado al manejo de la enfermedad.

Por último, se analizó el impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida de seguimiento de los pacientes. Para ello, se compararon los datos de recuperación de pacientes con ARN-VHC detectable en los 14 meses antes y en los 14 meses después de la instauración de las políticas de emergencia por el COVID-19 (implementadas el 13 de marzo de 2020).

#### **4.4. Análisis estadístico**

Las variables cuantitativas con una distribución normal se compararon mediante la prueba de la t de Student y se expresaron como media ± desviación estándar (DE). Las variables con una distribución no normal se analizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney y se expresaron como mediana y rango intercuartílico [RIC]. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de la chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando las frecuencias eran inferiores al 5%, y se expresaron como frecuencias y porcentajes. Se realizó la correlación de Pearson para comparar la carga viral en sangre venosa y en la sangre seca. El intervalo de confianza del 95% de las proporciones se calculó mediante el método de Newcombe <sup>159</sup>. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fue inferior a 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los softwares IBMSPSS, 26 (SPSS Inc., Armonk, NY, EE.UU.) o EPIDAT 3.



## 5. Resultados

### 5.1. PRIMER ESTUDIO: Seguimiento a largo plazo de pacientes infectados por el VHC con enfermedad renal crónica en estadio terminal tras una respuesta virológica sostenida con antivirales de acción directa

#### 5.1.1. Características basales de los participantes

Ciento treinta y cinco participantes de 31 hospitales participaron en el estudio Vie-KinD y 125 (92.6%) consiguieron una RVS12. Sesenta y seis (52.8%) de los que consiguieron una RVS12 fueron seguidos durante más de 6 meses y se incluyeron en el presente estudio. La mayoría eran hombres (69.7%), con una mediana [RIQ] de edad de 58 [51-70] años, el 98,5% eran caucásicos y 25 (37.9%) tenían cirrosis hepática, tres de ellos con historia previa de descompensación hepática pero compensada en el momento del tratamiento con AAD. Las comorbilidades más frecuentes fueron hipertensión en 48 (72.7%), diabetes mellitus en 15 (22.7%) y dislipidemia en 19 (28.8%) pacientes. En cuanto a la enfermedad renal, 3 (4.5%) presentaban ERC estadio 3b, 10 estadio 4 (15.2%) y 53 (80.3%) estadio 5. Cincuenta y tres (80.3%) pacientes estaban bajo TRS, 49 (92.5%) en hemodiálisis y 4 en diálisis peritoneal. Treinta y un pacientes (47.0%) tenían antecedentes de trasplante renal previo. En el estudio VieKinD no se observaron cambios en los valores medios de creatinina y TFGe en la RVS a la semana 12 comparado con el inicio de tratamiento. Las medianas de creatinina y de TFGe antes del tratamiento con AAD fueron de 5.6 [3.7-7.8] mg/dL y 10 [6.3-15.2] mL/min/1.73 m<sup>2</sup> y de 6.4 [4.3-8.3] mg/dL y 8 [6-16] mL/min/1.73 m<sup>2</sup> en la RVS12. Las características de los pacientes del estudio en el momento del inicio de los AAD se resumen en la Tabla 3.

<b>Características basales (n=66)</b>	
<b>Sexo</b> (hombre)	46 (69.7%)
<b>Edad</b> (años)	58 [51-70]
<b>Raza</b> (Caucásico)	65 (98.5%)
<b>Hipertensión</b>	48 (72.7%)
<b>Diabetes</b>	15 (22.7%)
<b>Dislipemia</b>	19 (28.8%)
<b>VHC-VIH</b>	3 (4.5%)
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>L)</b>	164 [133 – 210]
<b>Albúmina (mg/dl)</b>	4.1 [3.7 – 5.0]
<b>Bilirrubina (mg/dl)</b>	0.5 [0.4 – 0.6]
<b>Cirrosis</b>	25 (37.9%)
<b>Fibrosis</b>	
- F0-F1	19 (28.8%)
- F2	9 (13.6%)
- F3	13 (19.7%)
- F4	25 (37.9%)
<b>Trasplante renal</b>	31 (47%)
<b>Estadio ERC</b>	
- ERC 3b	10 (4.5%)
- ERC 4	10 (15.2%)
- ERC 5	53 (80.3%)
<b>TRS</b>	53 (80.3%)
- Hemodiálisis	49 (92.5%)

**Tabla 3.** Características basales de los pacientes incluidos en el seguimiento.

### 5.1.2. Evolución de la función renal tras alcanzar RVS

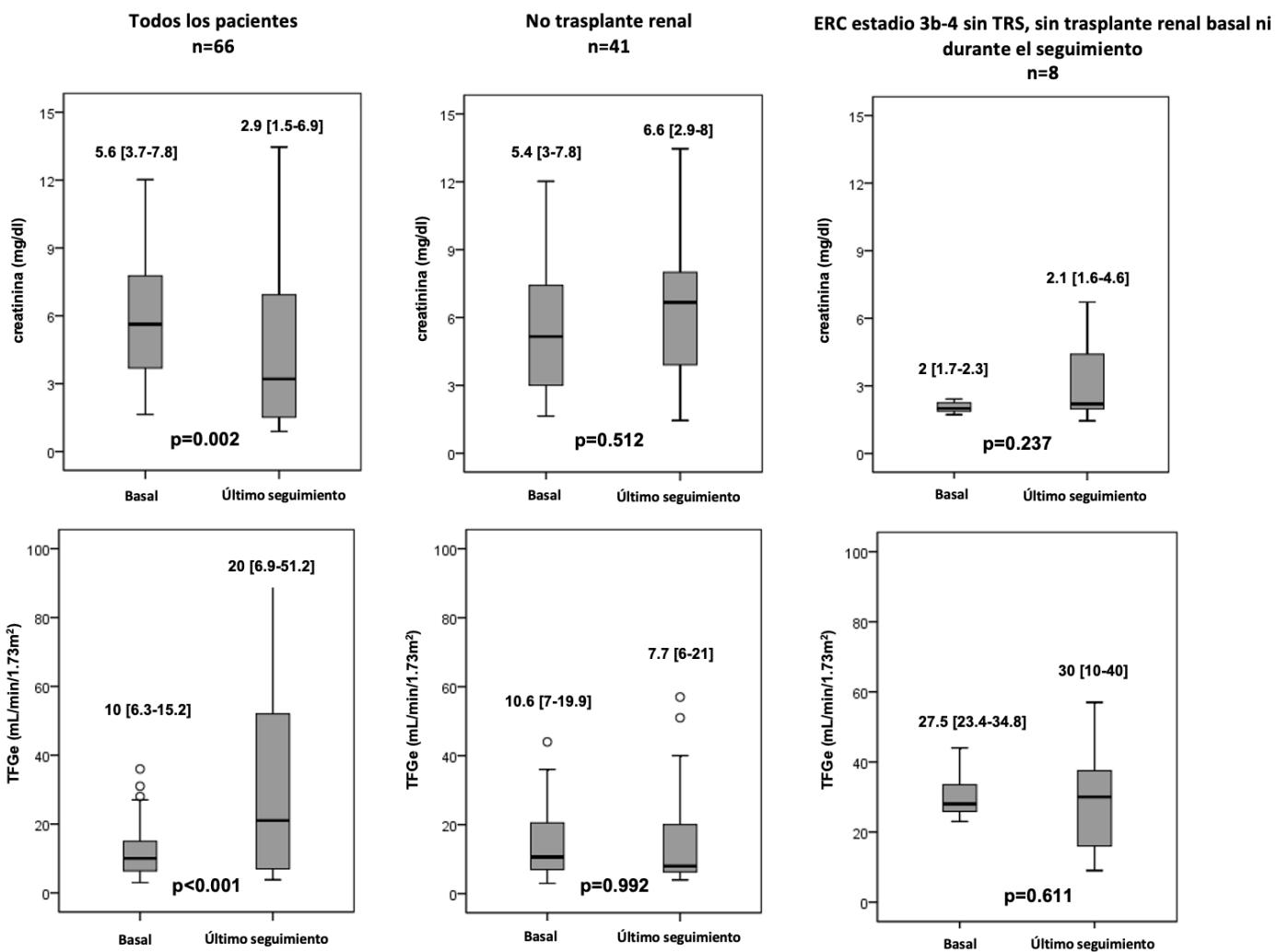
Veinticinco (37.9%) pacientes recibieron un trasplante renal en un periodo mediano de 2.3 [0.9-2.8] años y ninguno de ellos falleció. Ninguno de estos pacientes presentaba coinfección por VIH. La mayoría de estos pacientes (84.0%) presentaban ERC estadio 5, 19 (76.0%) estaban en TRS al inicio del tratamiento con AAD. A pesar de que 7 (28.0%) de estos pacientes presentaban cirrosis hepática, ninguno requirió un trasplante combinado (renal-hepático). En global, se observó una mejoría de la creatinina sérica (5.6 [3.7-7.8] mg/dl frente a 2.9 [1.5-6.9] mg/dl,  $p = 0.002$ ) y de la TFG<sub>e</sub> (10 [6.3-15.2] ml/min/1.73 m<sup>2</sup> frente a 20 [6.9-51.2] ml/min/1.73 m<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ) tras una mediana de seguimiento de 4.5 [3.7-5.1] años. Por el contrario, no se observaron cambios en los

valores de creatinina ni de TFGe entre los 41 (62.1%) pacientes que no recibieron un trasplante renal (creatinina: 5.4 [3-7.8] mg/dL frente a 6.6 [2.9-8] mg/dL,  $p = 0.512$ ; TFGe: 10.6 [7-19.9] ml/min/1.73 m<sup>2</sup> frente a 7.7 [6-21] ml/min/1.73 m<sup>2</sup>,  $p = 0.992$ ). La mediana de seguimiento de estos 41 pacientes fue de 4 [2-5] años.

El estadio de insuficiencia renal mejoró en 6 (14.6%) pacientes y empeoró en 3 pacientes ( $p < 0.001$ ) (Tabla 4). En el último seguimiento, 35 pacientes estaban bajo TRS: 30 de los 53 que estaban previamente bajo TRS y 5 pacientes que requirieron inicio TRS. La mejoría de la función renal condujo a la interrupción de la TRS en 3 pacientes, lo que supuso una tasa de abandono de la TRS del 5.6%. Finalmente se observó un ligero incremento en los valores de TFGe en aquellos 8 pacientes que presentaban ERC estadio 3b-4 antes del tratamiento con AAD, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 9).

		Estadio ERC al inicio de AADs			
		Estadio 3b	Estadio 4	Estadio 5	Total
Estadio ERC en el último seguimiento	Estadio 3a	1 (2.4%)	0	1 (2.4%)	2 (4.9%)
	Estadio 3b	2 (4.9%)	1 (2.4%)	0	3 (7.3%)
	Estadio 4	0	2 (4.9%)	3 (7.3%)	5 (12.2%)
	Estadio 5	0	3 (7.3%)	28 (68.3%)	31 (75.6%)
	Total	3 (7.3%)	6 (14.6%)	32 (78.1%)	41 (100%)

**Tabla 4.** Distribución del estadio de la enfermedad renal crónica al inicio y en el último seguimiento en los 41 pacientes que no recibieron un trasplante renal.



**Figura 9.** Mediana de creatinina y TFGe antes del tratamiento con AAD y en el último seguimiento en toda la cohorte, los pacientes que no recibieron trasplante renal y aquellos ERC estadio 3b-4 sin TRS ni trasplante renal.

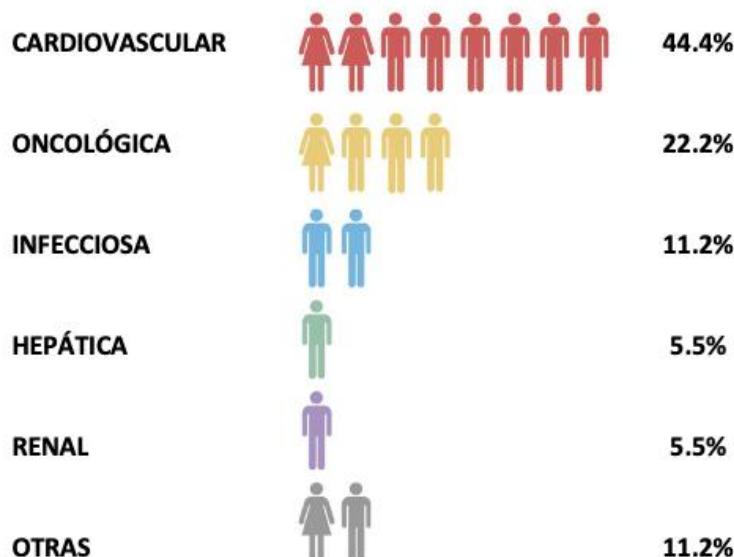
### 5.1.3. Evolución de la enfermedad hepática

Durante el seguimiento, 2 (5.3%) pacientes con cirrosis compensada basalmente desarrollaron descompensación hepática (ascitis y encefalopatía hepática, respectivamente). Además, 1 paciente (2.6%) con cirrosis hepática desarrolló un carcinoma hepatocelular (CHC) en el primer año tras alcanzar la RVS. Ninguno de ellos estaba infectado por el VIH. Ningún paciente requirió trasplante hepático. El único paciente que falleció por enfermedad hepática presentaba cirrosis basalmente. El ARN

del VHC se determinó al menos una vez tras la RVS en 51 sujetos (39 en el último seguimiento y 12 pacientes adicionales durante el control prospectivo) y no se detectó ningún caso de reinfección.

#### 5.1.4. Mortalidad global y comparación de las tasas de mortalidad con una cohorte histórica de pacientes con ERC

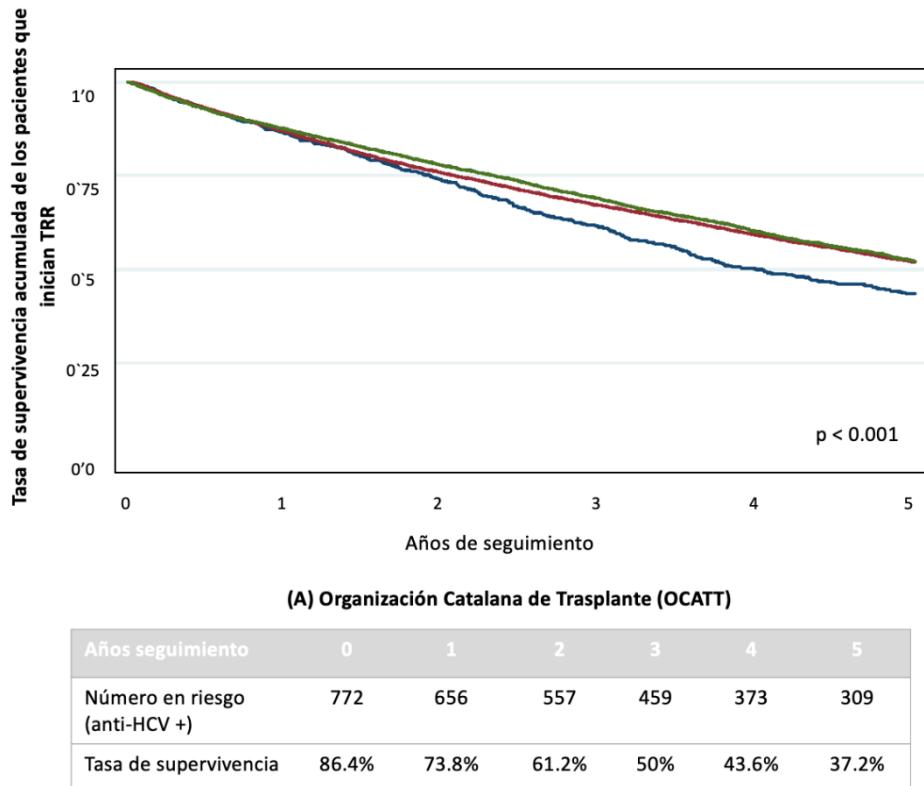
Dieciocho (27.3%) pacientes, 16 (88.9%) de ellos bajo terapia renal sustitutiva (TRS), fallecieron. Las principales causas de mortalidad se muestran en la figura 10. La tasa de mortalidad entre los 53 pacientes que estaban bajo TRS al inicio del tratamiento antiviral fue del 26.4% y del 30.8% en los que no la recibían ( $p = 0.5$ ). La mortalidad entre los 30 pacientes que permanecieron en TRS durante todo el seguimiento fue del 40.0%.



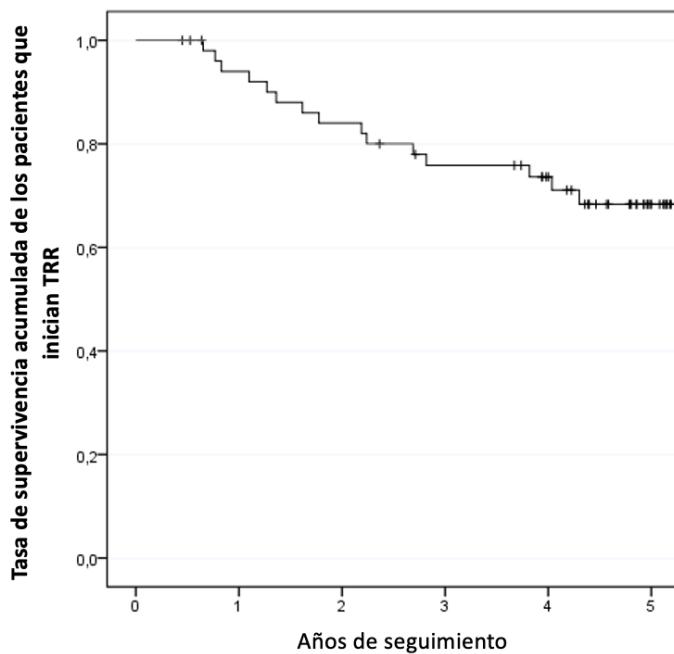
**Figura 10.** Causas de mortalidad.

Los pacientes cirróticos tuvieron una mortalidad del 44.0%, significativamente mayor que en los no cirróticos (17.1%) ( $p = 0.02$ ). La tasa de supervivencia de nuestra cohorte de 53 pacientes con VHC sometidos a TRS se comparó con la de una cohorte histórica de la OCATT que incluía 16834 pacientes que iniciaron TRS entre 2000 y 2019. Esta cohorte incluía 772 pacientes anti-VHC positivos que iniciaron TRS entre 2000 y 2015. No se pudieron recuperar datos del porcentaje de pacientes con VHC virémicos. No se

observaron diferencias en la tasa de supervivencia entre los anti-VHC negativos que iniciaron TRS entre 2000 y 2010 y los que lo hicieron entre 2011 y 2019, aunque fue mayor que la observada entre los anti-VHC positivos ( $p < 0.001$ ). Para la comparación con nuestra cohorte, sólo se incluyeron los 53 pacientes que estaban en TRS antes del tratamiento con AAD. La supervivencia a los cuatro años en nuestra cohorte fue del 75.1%, significativamente superior a la observada en la cohorte anti-VHC positiva de la OCATT a los cuatro años (75,1% frente a 43.6%.  $p < 0.001$ ).



**Figura 11a.** Comparación de la tasa de supervivencia con una cohorte histórica de pacientes con ERC. (A) Tasa de supervivencia a los cinco años de tres cohortes de pacientes sometidos a TRS (OCATT). La línea azul corresponde a pacientes anti-VHC positivos que iniciaron TRS entre el año 2000 y 2015. La línea roja corresponde a los pacientes anti-VHC negativos que iniciaron TRS entre los años 2000 y 2010 y la línea verde a los pacientes anti-VHC negativos que iniciaron TRS entre los años 2011 y 2019.



(B) Cohorte Vie-KinD

Años seguimiento	0	1	2	3	4	5
Number at risk (anti-HCV +)	53	46	41	36	30	9
Tasa de supervivencia	100 %	93.9%	83.7%	77.4%	75.1%	69.7%

**Figura 11b.** Tasa de supervivencia a cinco años de los 53 pacientes que estaban bajo TRS antes del inicio de la terapia con AAD.

### 5.1.5. Seguimiento prospectivo

Veinticuatro (36.4%) pacientes (14 hombres y 10 mujeres) acudieron a una nueva visita médica en la que se realizó una evaluación clínica y analítica. La mediana de seguimiento de esta cohorte fue de 5.3 [4.9-5.4] años. Durante este periodo, 14 (58.3%) habían recibido un trasplante renal. Entre los 10 pacientes que no se trasplantaron, 8 presentaban una ERC estadio 5 al inicio del tratamiento con AAD y no se observó mejoría de la función renal durante el seguimiento. En cambio, en los dos pacientes restantes, ambos con ERC estadio 3b al inicio del tratamiento, el estadio de la ERC mejoró a estadio 1 y 2 respectivamente ( $p = 0.2$ ). Se realizó una ET hepática en 19 (79.2%) pacientes, mostrando una mejoría significativa de la fibrosis hepática (seguimiento: 6.2 [5-10.1] kPa frente a 9.7 [6.1-14.4] kPa al inicio,  $p = 0.027$ ). De los 12 sujetos con ET hepática

indicativa de fibrosis avanzada basalmente, sólo seis (50%) presentaron valores por encima de 12.5 kPa en la evaluación prospectiva. No se detectó ninguna reinfección por el VHC entre estos 24 pacientes.

## **5.2. SEGUNDO ESTUDIO: Validación y estandarización del diagnóstico serológico y molecular de Hepatitis C y B en muestras de sangre seca mediante tarjetas de separación de plasma**

### **5.2.1. Resultados serológicos de hepatitis B, C y D**

En total se incluyeron 201 muestras de pacientes con hepatitis víricas crónicas: 126 HBsAg positivos y 77 anti-VHC. Dos (1%) pacientes presentaban positividad para ambos marcadores. De los 126 pacientes con HBsAg positivo, 16 (12.7%) eran HBeAg positivo y 13 (10.3%) presentaban anticuerpos anti-VHD. De los 126 pacientes HBsAg positivo en sangre venosa, 124 (98.4%) fueron detectados en sangre capilar almacenada en TSP. Se produjeron 2 (1.6%) falsos negativos por TSP (ambos con HBsAg débilmente positivo en sangre venosa: HBsAg cuantificado de 0.1 y 0.08 UI/mL, respectivamente) y 3 (2.4%) falsos positivos (anti-HBc negativos). Mediante TSP se detectaron 76 (98.7%) de los 77 pacientes anti-VHC positivos. El único falso negativo correspondió a un paciente anti-VHC positivo débil (cercano al punto de corte de la técnica) no virémico en la muestra de sangre venosa.

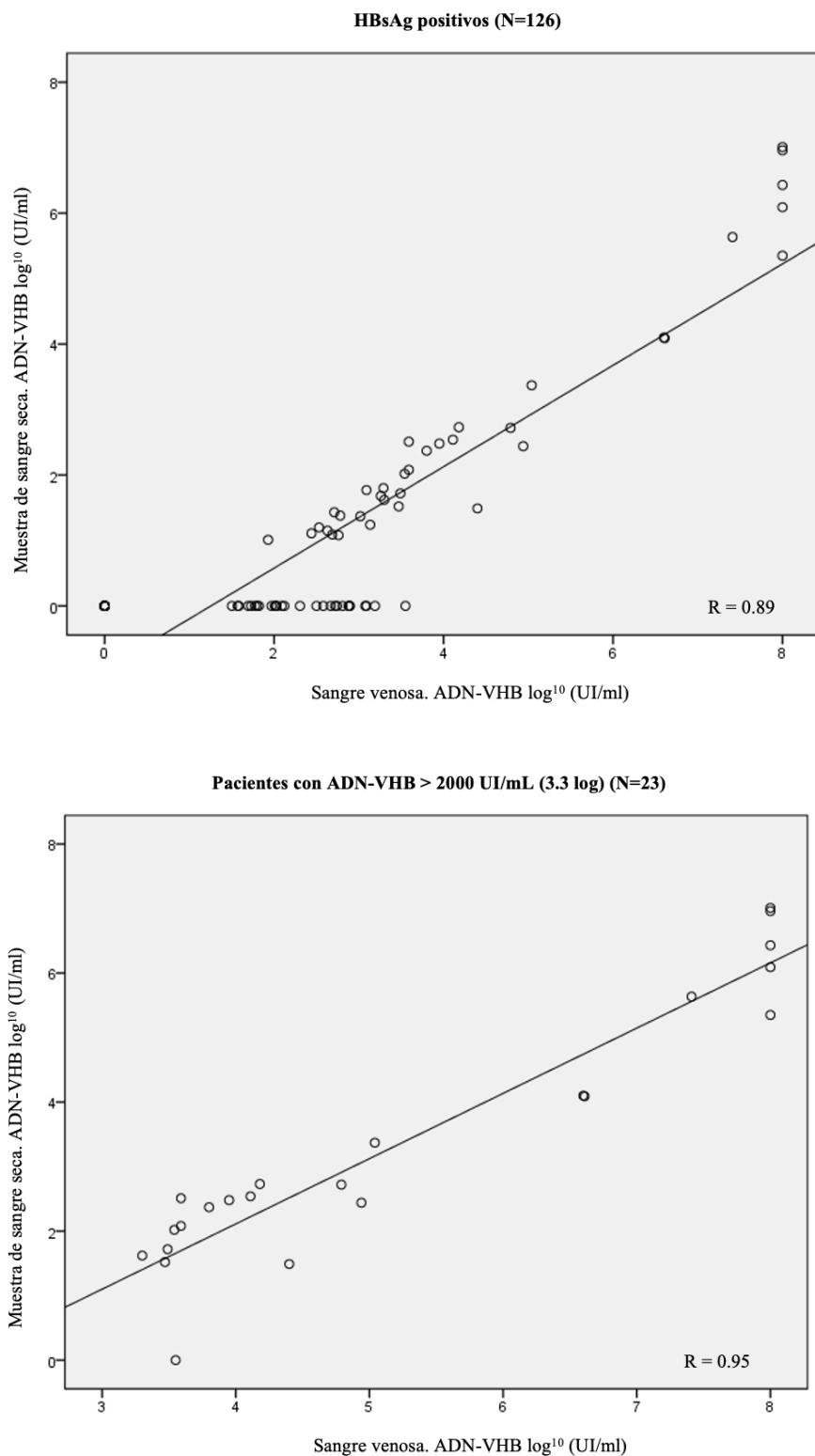
Por lo tanto, la sensibilidad del análisis de sangre seca en TSP para el VHB y VHC fue del 98.4 % y del 98.7% respectivamente, con una especificidad del 96% y 100 %. Ciento cuarenta y cinco (72.1%) pacientes presentaron anti-HBc positivos en las muestras de sangre venosa, todos los HBsAg positivo y 19 pacientes con anti-HCV positivo. En comparación, se detectaron 139 (95.9%) de los 145 anti-HBc positivos en las muestras de sangre capilar almacenada en la TSP. Los 6 falsos negativos para anti-HBc presentaban ADN del VHB indetectable. Once de los 13 pacientes con anti-VHD positivo en sangre venosa fueron detectados en las muestras de sangre capilar en TSP obteniendo una sensibilidad y especificidad del 84.6% y 100% respectivamente. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de sangre seca almacenada en TSP en comparación con las muestras de sangre venosa están resumidos en la tabla 5.

	<b>Sensibilidad (IC 95%)</b>	<b>Especificidad (IC 95%)</b>	<b>VPP (IC 95%)</b>	<b>VPN (IC 95%)</b>
anti-VHC	98.7% (93.0-99.8)	100% (97.0-100.0)	100% (95.3-100.0)	99.2% (95.6-99.9)
HBsAg	98.4% (94.4-99.6)	96.2% (89.3-98.7)	97.7% (93.4-99.2)	97.5% (91.2-99.3)
anti-HBc	95.9% (91.3-98.1)	100% (93.6-100.0)	100% (97.4-100.0)	90.3% (80.5-95.5)
anti-VHD	84.6% (57.8-95.7)	100% (88.3-100.0)	100% (77.2-100.0)	93.5% (71.7-100.0)

**Tabla 5.** Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las serologías de VHB, VHC y VHD en muestras de sangre seca en TSP comparadas con las muestras de sangre venosa.

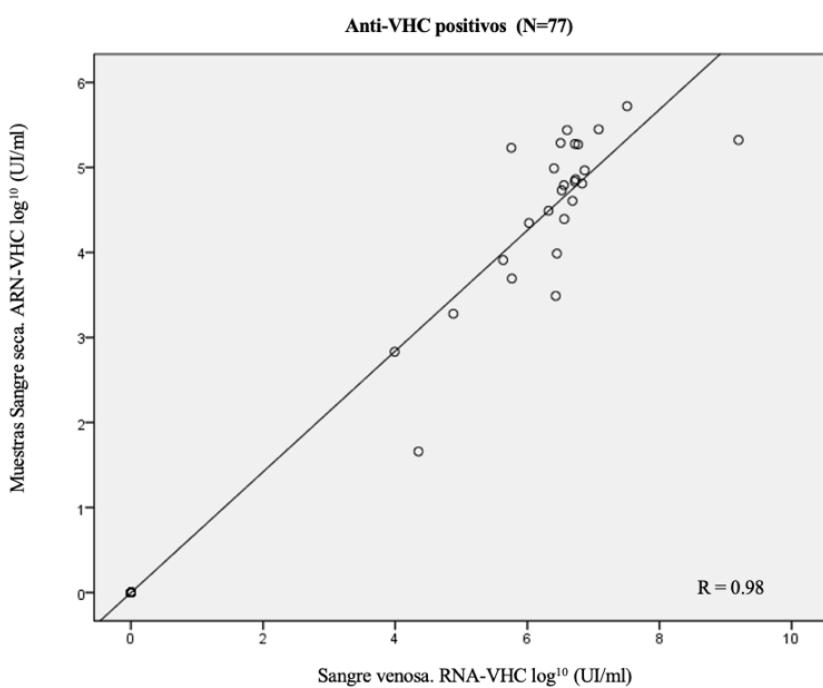
### 5.2.2. Resultados virológicos de las hepatitis B, C y D

De los 126 pacientes HBsAg positivos, 78 (61.9%) presentaban ADN-VHB detectable en las muestras de sangre venosa, mientras que solo se detectó ADN-VHB en 42 (33.3%) muestras de sangre capilar en TSP. Mediante las TSP únicamente se detectaron un 53.8% de los pacientes virémicos. La carga viral media del VHB fue de 2.8 ( $\pm 2.1$ ) log UI/mL en las muestras de sangre venosa y de 1.2 ( $\pm 1.8$ ) log UI/mL en las muestras de sangre capilar en TSP. A pesar de que la cuantificación de ADN-VHB fue de 1.6 log UI/mL menor a las muestras de sangre venosa, se evidenció una alta correlación entre las dos muestras ( $R = 0.89$ ). En contraposición, la carga viral del VHB en muestras de sangre capilar en TSP se detectó en 22 de los 23 pacientes con ADN-VHB  $> 2000$  UI/mL (3.3 log UI/mL) presentando además una mayor correlación entre ambas muestras ( $R = 0.95$ ). Las correlaciones entre la carga viral venosa y capilar en pacientes HBsAg-positivos se muestran en la figura 12.



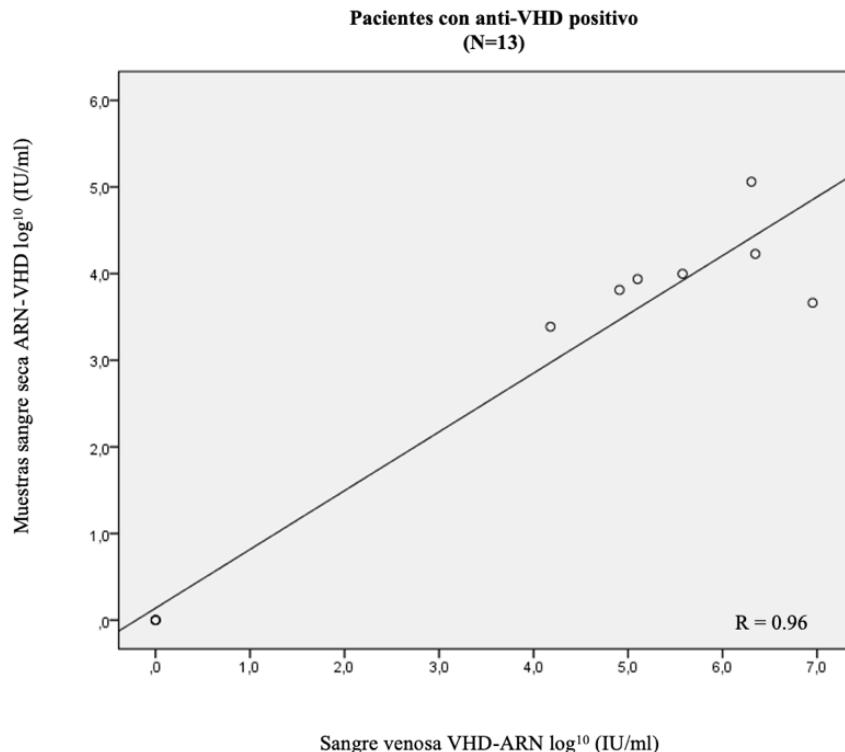
**Figura 12.** Correlación de la carga viral del VHB y de aquellas muestras con ADN-VHB > 2000 UI/mL (3.3log<sup>10</sup>) entre las muestras en TSP y en sangre venosa.

Se detectó ARN del VHC en 26 (33.7%) de los 77 pacientes anti-HCV positivos en sangre venosa incluyendo los dos pacientes con coinfección VHC-VHB. La mediana de la carga viral en muestras de sangre venosa fue de 6.54 log UI/mL [IQR 5.96-6.74]. Todos los pacientes virémicos en sangre venosa fueron detectados también por medio de las muestras de sangre capilar en TSP si bien la mediana de carga viral fue menor (4,8 log UI/mL [IQR 3,97-5,27]). La diferencia media de carga viral entre ambas muestras fue de 1.1 log UI/mL. La correlación del ARN-VHC entre las dos muestras fue muy elevada ( $R = 0,98$ ). En la figura 13 se muestra la correlación de la carga viral del VHC entre muestras en TSP y en sangre venosa.



**Figura 13.** Correlación de la carga viral del VHC entre las muestras en TSP y en sangre venosa.

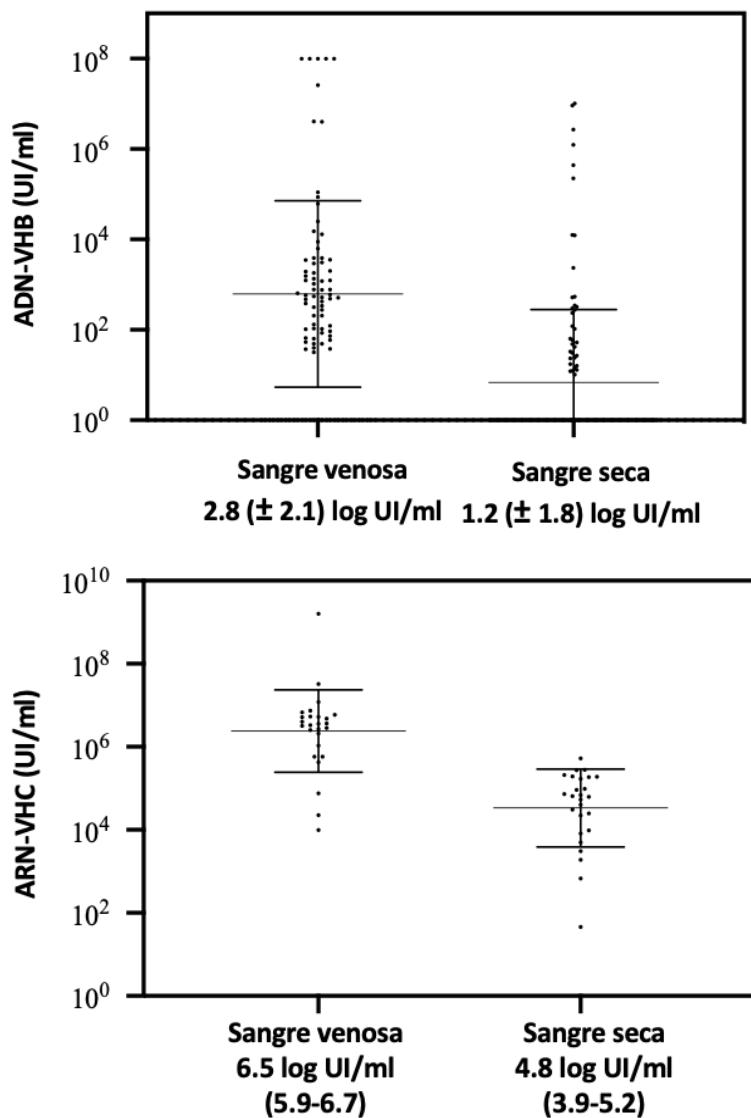
Por último, 10 (77%) de las 13 muestras anti-VHD positivas en sangre venosa tenían un ARN-VHD cuantificable. Únicamente se detectó ARN-VHD en 7 (70%) muestras de sangre capilar en TSP. La media de ARN-VHD fue de 4.2 ( $\pm 2.6$ ) log (UI/mL) en las muestras de sangre venosa y de 2.8 ( $\pm 1.99$ ) log UI/mL en las muestras de sangre capilar en TSP. La diferencia media entre ambas muestras fue de 1.1 ( $\pm 1.04$ ) log UI/mL con una correlación alta ( $R = 0.96$ ). En la figura 14 se muestra la correlación del ARN-VHD entre ambas muestras.



**Figura 14.** Correlación de la carga viral del VHD entre muestras en TSP y en sangre venosa.

	<b>Sensibilidad (IC 95%)</b>	<b>Especificidad (IC 95%)</b>	<b>VPP (IC 95%)</b>	<b>VPN (IC 95%)</b>
ADN-VHB • >2000 UI/ml (3.3 log)	53.8% (42.3-64.5) 95.7% (79.0-99.2)	100% (90.4-100.0) 100% (93.6-100.0)	100% (91.6-100.0) 100% (85.1-100.0)	57.1% (46.5-67.2) 98.2% (90.7-99.7)
ARN-VHC	100% (87.1-100.0)	100% (93.0-100.0)	100% (87.1-100.0)	100% (93.0-100.0)
ARN-VHD	70% (39.7-89.2)	100% (43.9-100.0)	100% (64.6-100.0)	50% (18.7-81.2)

**Tabla 6.** Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del análisis virológico de VHB, VHC y VHD en las muestras de sangre seca en TSP comparadas con las muestras de sangre venosa.



**Figura 15.** Media de ADN-VHB en muestras de sangre venosa y sangre seca en TSP y mediana de ARN-VHC en muestras de sangre venosa y sangre seca en TSP.

### 5.2.3. Estudio prospectivo en el Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal, Benguela, Angola)

Se incluyeron 93 individuos en el estudio prospectivo realizado en Cubal (Angola). La edad media fue de 40.5 ( $\pm 13.4$ ) años y 57 (61.3%) eran mujeres. Quince (16.1%) personas habían recibido al menos una transfusión de sangre, 7 (7.5%) presentaban tatuajes en la piel, 11 (11.8%) presentaban conductas sexuales de riesgo, 16 (17.2%) se habían sometido a intervenciones quirúrgicas, 35 (97.2%) de 36 hombres habían sido circuncidados, 43 (46.2%) refirieron la realización de al menos un procedimiento de

escarificación cutánea y 61 (65.5%) explicaban al menos un episodio de ictericia en su vida. Ningún participante refirió usar drogas por vía intravenosa. Ningún participante resultó positivo para anti-VHC o anti-VHD en las muestras de sangre seca en TSP analizadas en el laboratorio del Hospital Vall Hebron. Por el contrario, 10 (10.8%) participantes resultaron positivos para HBsAg. Cuatro de ellos eran hombres con una mediana de edad de 32.5 [25-54] años. Se detectó ADN-VHB en 6 de los 10 casos positivos para el HBsAg (60%).

### **5.3. TERCER ESTUDIO: Análisis de coste-efectividad de la estrategia ReLink-C para recuperar pacientes con infección por VHC perdidos en el seguimiento e impacto de la pandemia por COVID-19 en la pérdida de seguimiento y recuperación de pacientes**

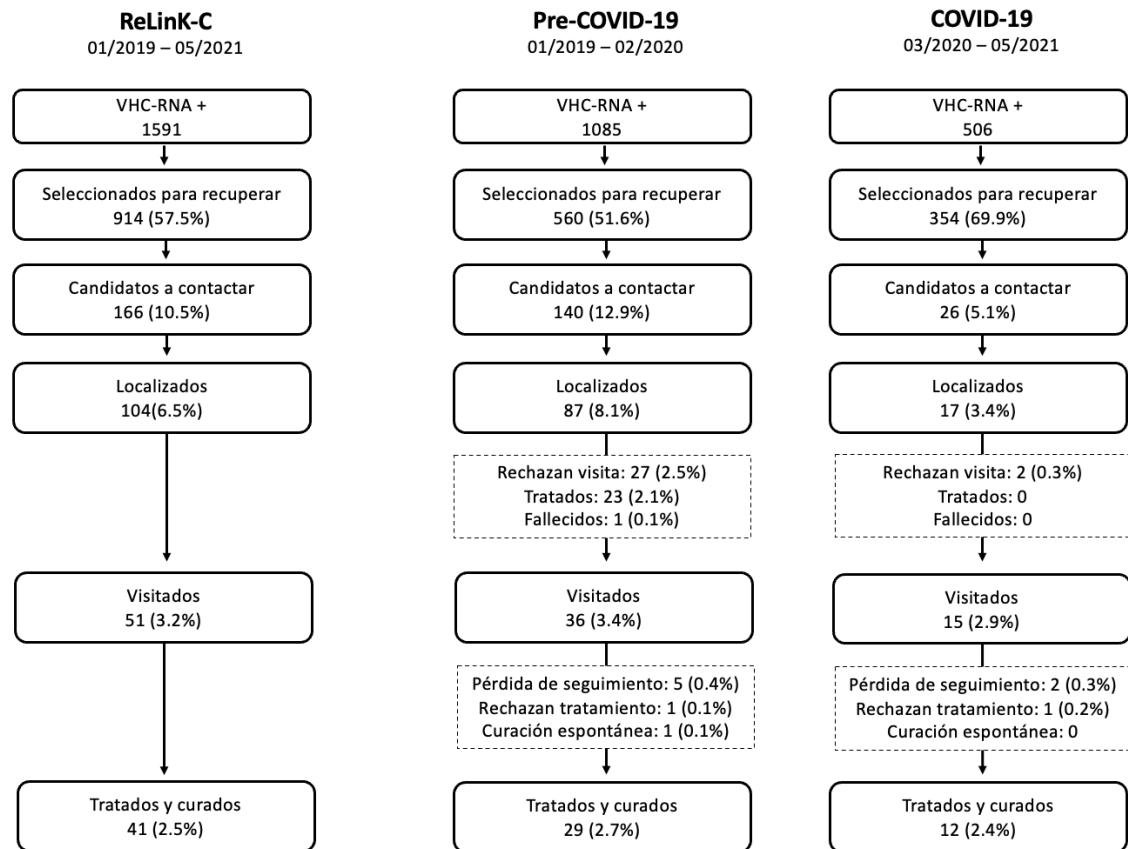
#### **5.3.1. Estrategia ReLink-C**

Se identificaron 1591 pacientes con ARN del VHC positivo en el laboratorio del Hospital Vall Hebron. De ellos, 599 (37.6%) ya habían sido tratados o vinculados al sistema sanitario, 78 (5%) habían fallecido y 914 (57.4%) habían sido perdidos o no se disponía de información respecto al tratamiento de la infección y fueron seleccionados para ser recuperados. Entre estos 914 pacientes, 166 (18.1%) fueron candidatos a ser contactados. Entre los que no cumplían los criterios para ser contactados se encontraban 379 (41.5%) que presentaban una esperanza de vida limitada o comorbilidades o contraindicaciones para el tratamiento del VHC y en 369 (40.4%) no existían datos de contacto en la historia clínica o los datos eran erróneos. Tras un máximo de 5 llamadas telefónicas, se localizó a 104 (62.6%) de los 166 candidatos y 51 (49.1%) aceptaron acudir a una visita. De los que no accedieron a la visita médica, 29 la rechazaron por motivos personales, 23 ya estaban bajo tratamiento con AAD y 1 había fallecido. Finalmente, 43 (84.3%) pacientes acudieron a la visita médica y 41 (95.4%) fueron tratados con AAD, representando un 2.5% de los 1591 individuos ARN-VHC positivos identificados a partir de los registros del laboratorio y un 4.5% de aquellos 914 seleccionados para recuperar. En la figura 16 se puede ver el diagrama de flujo de la estrategia ReLink-C y la comparación de las pérdidas de pacientes y recuperación en los períodos pre-COVID-19 y COVID-19 en los que se realizó el estudio.

#### **5.3.2. Impacto de la pandemia por COVID-19**

Durante el periodo de la pandemia por COVID-19 se detectaron menos de la mitad de casos de ARN-VHC positivos en el laboratorio del Hospital Vall Hebron y la vinculación al sistema sanitario fue menor que en el periodo anterior a la pandemia (14 meses antes del estado de alarma) (27% vs 43%;  $p < 0.0001$ ) por lo que un mayor porcentaje de casos fue seleccionado para ser recuperado (69.9% vs 51.6%;  $p < 0.0001$ ). El número de candidatos a contactar y los candidatos localizados fue menor durante el periodo de

pandemia por COVID-19 ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.005$  respectivamente). Al final del análisis, sin embargo, un porcentaje similar de casos iniciaron tratamiento en los dos grupos (2.7% vs 2.4%;  $p = 0.7$ ).

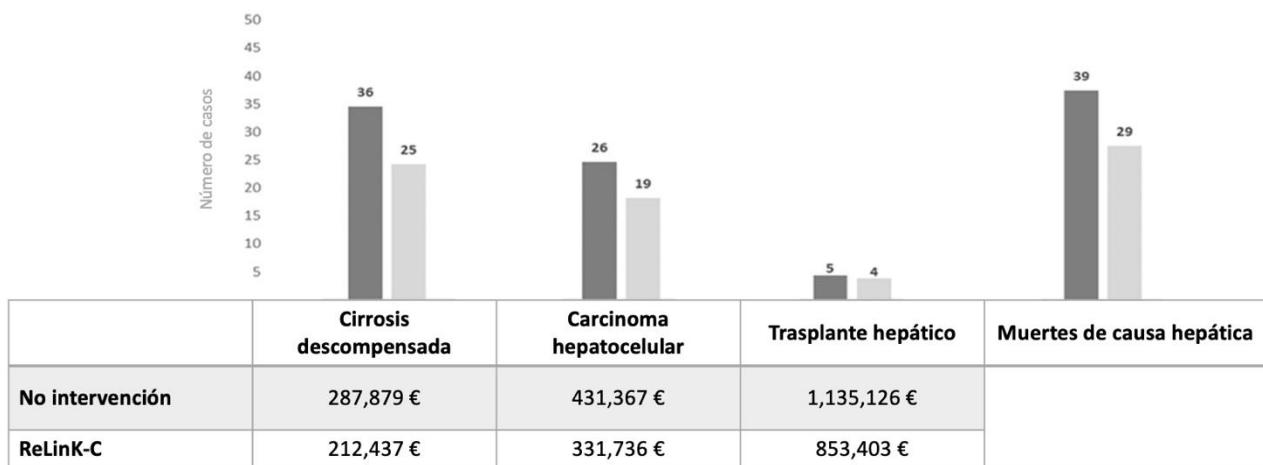


**Figura 16.** Diagrama de flujo de la estrategia ReLink-C y comparación de las pérdidas de pacientes y recuperación en los períodos pre-COVID-19 y COVID-19 en los que se realizó el estudio.

### 5.3.3. Análisis de coste-efectividad

La edad media de los pacientes que entraron en el modelo fue de 57 años según los datos de nuestro estudio y la distribución entre los distintos estados de salud y la respuesta virológica sostenida (92-97%) se obtuvo a partir de datos oficiales. El coste del diagnóstico de todos los pacientes que acudieron a la visita médica fue de 19.924 euros. El coste del personal sanitario que intervino en la estrategia ReLink-C fue de 6151 euros por lo que la inversión total de la estrategia fue de 26075 euros. Para el análisis de Markov se incluyeron 141 pacientes con ARN-VHC positivo. Se excluyeron los 23

pacientes ya tratados, el único paciente fallecido y la única curación espontánea detectada. Según nuestro análisis, el tratamiento de 41 pacientes con AAD frente a no tratar a ninguno de estos pacientes (no intervención) redujo los casos de cirrosis descompensada y CHC en un 30% y 27% respectivamente y la necesidad de trasplante hepático en un 20%. Además, la reducción de las complicaciones hepáticas generó unos ahorros estimados de 456,796 euros. En la figura 17 se muestran el número de casos de complicaciones hepáticas, mortalidad y costes proyectados en la vida de los pacientes.



**Figura 17.** Análisis económico de la estrategia ReLink-C comparado con la no intervención.



## 6. Discusión

Los retos que plantean la eliminación de las hepatitis virales crónicas a nivel mundial y el impacto derivado de alcanzar este objetivo son el hilo conductor y la unión de los tres estudios presentados en esta tesis doctoral.

El primero de ellos se ha centrado en analizar el impacto a largo plazo del tratamiento de la infección crónica por VHC en un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de infección y en los que suele existir una gran comorbilidad y mortalidad. Por ello, estimar el impacto de la eliminación del VHC en este escenario es una tarea difícil, especialmente cuando el daño orgánico ya está ampliamente establecido, es decir, en estadios avanzados de la enfermedad. Hasta la fecha los resultados presentados en esta tesis doctoral representan uno de los seguimientos más largos descritos en la literatura sobre la evolución de pacientes con ERC terminal y VHC tratados con AAD.

Los resultados de nuestro estudio <sup>160</sup> han mostrado una tendencia a la mejoría de la TFGe en aquellos pocos pacientes que presentaban un estadio de ERC 3b-4 antes del tratamiento con AAD, pero no en aquellos con ERC terminal, la amplia mayoría de los pacientes de nuestra cohorte. Los resultados globales han mostrado una mejoría de la función renal (creatinina y TFGe) en el último seguimiento, pero esto es debido a la mejoría de la función renal en aquellos pacientes en los que se les había realizado un trasplante renal. Una evaluación más realista de nuestros resultados es que la función renal no mejoró en los 41 pacientes que no recibieron un trasplante renal durante el seguimiento. Sin embargo, 3 (9.1%) pacientes pudieron interrumpir la TRS y 6 (14.6%) mostraron una mejoría del estadio de ERC.

Múltiples estudios han evaluado la evolución de la función renal o la enfermedad renal crónica durante y tras el tratamiento con AAD. Si bien parece innegable el hecho de que tratar y curar la infección por VHC disminuye el riesgo de desarrollar insuficiencia renal a largo plazo <sup>161, 121</sup>, la mejoría de la función renal durante y tras el tratamiento en pacientes con ERC no está clara. Datos recientes de una cohorte de 606 pacientes tratados con AAD ha mostrado un descenso significativo de la función renal tras dos años de seguimiento. En este estudio la hipertensión y una mayor TFGe basal se relacionaron con un mayor descenso de la TFGe al final del seguimiento <sup>162</sup>. De forma similar, el

seguimiento de 1536 pacientes con VHC, 225 (14.6%) de los cuales presentaban insuficiencia renal, mostró una disminución significativa de la TFGe tras un año de seguimiento. En este caso el mayor riesgo de deterioro de la función renal se vio en aquellos pacientes hipertensos, aquellos con una TFGe < 60ml/min/m<sup>2</sup> y en aquellos con un trasplante hepático <sup>163</sup>. En contraposición, datos de seguimiento a dos años de una cohorte de 425 pacientes tratados con AAD ha descrito un efecto neutro tras alcanzar la RVS. Si bien hay que destacar que la edad media de esta cohorte era 10 años menor que la edad media en las cohortes previamente descritas <sup>164</sup>. Estos datos contrastan con el estudio de Coppola *et al.* en el que si se describió una mejoría de la función renal en los 68 pacientes con ERC (< 60ml/min/1.73m<sup>2</sup>) a la semana 12 después del tratamiento con AAD. En esta cohorte, la edad media fue de 69 años y solo un 9.6% de los pacientes presentaba diabetes. La escasa inclusión de pacientes con ERC terminal, el menor tiempo de seguimiento de la mayoría de estudios y la heterogeneidad en la definición de mejoría de la función renal.

La edad avanzada y el sexo masculino se han relacionado con la progresión de la enfermedad renal. La mediana de edad al inicio del tratamiento con AAD en nuestra cohorte era de aproximadamente 60 años y casi dos tercios eran hombres. Además, no encontramos ninguna mejora significativa en las comorbilidades cardiovasculares tras la eliminación del VHC. Asimismo, no pudimos evaluar la presencia de crioglobulinemia ni al inicio ni durante el seguimiento y tampoco la presencia o cambios en la albuminuria o proteinuria como marcadores de progresión de la ERC por la falta de datos consistentes en la revisión retrospectiva. Por lo tanto, en base a la literatura presentada y basándonos en nuestros resultados, creemos que el aclaramiento del VHC tiene un probable impacto positivo en la función renal, aunque este efecto es complicado de evaluar dada la gran comorbilidad asociada, la edad avanzada de los pacientes incluidos en la mayoría de las cohortes. En conclusión, nuestros datos sugieren que no existe mejoría de la función renal tras el tratamiento con AAD en pacientes con ERC avanzada.

A pesar de que aproximadamente el 60% de nuestros pacientes presentaban fibrosis avanzada o cirrosis antes del tratamiento con AAD, la incidencia de descompensación hepática o de desarrollo de CHC fue baja y ningún paciente requirió un trasplante hepático. Hoy en día existe una amplia evidencia de que la curación de la infección por VHC disminuye el riesgo de progresión de la fibrosis y la mortalidad hepática. Un estudio

reciente en el que se incluyeron 869 pacientes con VHC curados describió una disminución del riesgo de progresión de la enfermedad hepática en los pacientes Child-Pugh A, pero no en los Child-Pugh B ni C <sup>111</sup>. De forma similar, los resultados del seguimiento a largo plazo de 1.760 pacientes con VHC mostraron una disminución significativa de la mortalidad por todas las causas y de las complicaciones hepáticas tras el tratamiento de la infección. Aunque algunos pacientes presentaron dichas complicaciones, la tasa de incidencia anual (4,1%) fue inferior a la tasa esperada durante la historia natural del VHC <sup>110</sup>.

En nuestra cohorte la incidencia de descompensación hepática fue del 5.3% y la de CHC de aproximadamente un 3%. Los pacientes que presentaron estos eventos tenían grados avanzados de fibrosis hepática antes del tratamiento del VHC y uno de ellos ya había presentado un episodio previo de descompensación. En relación al caso incidente de CHC, es importante señalar que se diagnosticó durante el primer año de seguimiento tras el tratamiento con AAD (10 meses después). Datos de seguimiento de una gran cohorte de pacientes con VHC tratados con AAD o IFN mostraron una incidencia bruta de CHC a los 3 años de tratamiento del 5.9%, alcanzando su máximo y estabilizándose al año de finalizar el tratamiento <sup>165</sup>. Aunque la curación del VHC detiene la progresión de la enfermedad hepática, la regresión de la fibrosis puede tardar años <sup>166</sup>. Por lo tanto, el riesgo de descompensación hepática o desarrollo de CHC, aunque disminuye, sigue siendo alto en estadios avanzados de fibrosis lo que podría explicar los eventos hepáticos observados en el seguimiento de nuestra cohorte. Por ello se recomienda el seguimiento clínico y ecográfico de estos pacientes.

En relación con la regresión de la fibrosis hepática, detectamos una mejoría significativa de los valores de ET hepática en los pacientes que fueron evaluados de forma prospectiva. Si bien una gran parte de la evidencia actual sustenta una falta de correlación entre los valores de la ET hepática posteriores a la curación del VHC y el estadio de fibrosis, un estudio reciente ha observado una reducción de las complicaciones hepáticas y de la mortalidad en aquellos pacientes con VHC en los que la ET hepática tras la curación de la infección disminuyó más de un 20% respecto al valor pre-tratamiento <sup>167</sup>. Asimismo, nuestra cohorte incluyó un alto porcentaje de pacientes con diabetes mellitus, hipertensión o dislipemia lo que dificulta descartar la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica como una posible etiología de la

progresión de la enfermedad hepática. En relación a ello, resultados de un estudio retrospectivo que incluyó más de 33000 pacientes con VHC tratados con AAD describió un riesgo aumentado de mortalidad y descompensación hepática entre los pacientes con diabetes mellitus <sup>168</sup>. En nuestra cohorte no observamos ninguna asociación entre diabetes mellitus y descompensación hepática. Por último, no se detectó ningún caso de reinfección por VHC entre los 51 pacientes que disponían de una determinación de ARN del VHC durante el seguimiento, lo que refleja la mejora en la prevención de la transmisión en pacientes expuestos a procedimientos invasivos como la hemodiálisis o las transfusiones de hemoderivados.

La mortalidad en nuestra cohorte fue elevada (27.3%), especialmente entre aquellos pacientes bajo TRS. Está ampliamente demostrado que los pacientes bajo TRS, y especialmente aquellos en hemodiálisis, presentan una mayor mortalidad comparado con la población general <sup>169</sup>. Si bien los eventos cardiovasculares son la principal causa de muerte en esta población, los pacientes con ERC terminal también parecen presentar una mayor incidencia de neoplasias <sup>170</sup>. A pesar de ello, existen aún algunas controversias. Resultados de un estudio retrospectivo que incluyó a más de un millón de adultos observó que el descenso de la TFG se asociaba de forma independiente con la incidencia de cáncer renal y urotelial pero no con otros tipos de neoplasias <sup>171</sup>. En nuestra cohorte los eventos cardiovasculares y el cáncer (2 de pulmón, 1 colorrectal y 1 de mama) fueron responsables de más del 50% de las muertes. Además, la mortalidad fue significativamente mayor en los pacientes cirróticos. Por último, la tasa de supervivencia de los pacientes que estaban bajo TRS fue significativamente superior a la observada en la cohorte de la OCATT a pesar de que los tamaños muestrales diferían mucho y no disponíamos del número de pacientes virémicos de la cohorte de la OCATT. Sin embargo, en España, el tratamiento con AAD no estuvo ampliamente disponible hasta 2015. Muchos pacientes, incluyendo aquellos con ERC terminal, no recibieron tratamiento hasta esa fecha por lo que asumimos que un gran número de pacientes anti-VHC positivos de la cohorte de la OCATT serían virémicos en ese momento, lo que podría explicar de manera razonable las diferencias observadas en las tasas de supervivencia.

Las principales limitaciones de este estudio son la naturaleza predominantemente retrospectiva de los datos y la proporción relativamente pequeña de pacientes de la

cohorte inicial del estudio VieKinD que pudieron ser incluidos. La pandemia por COVID-19 impidió la recuperación de datos por parte de algunas unidades sanitarias. En resumen, no observamos una mejoría de la función renal tras el tratamiento con AAD en nuestra cohorte si bien describimos una mejoría no significativa del TFG<sub>e</sub> en aquellos pacientes con estadio 3b-4 al inicio del tratamiento. Creemos que el elevado porcentaje de pacientes con ERC terminal o bajo TRS puede haber impedido observar una mejoría significativa de la función renal en este largo seguimiento. Nuestros datos sugieren una baja incidencia de descompensación hepática y desarrollo de CHC a pesar del gran porcentaje de pacientes con fibrosis avanzada de forma basal. Por último, la mortalidad a largo plazo de los pacientes con ERC terminal es elevada y relacionada principalmente con eventos cardiovasculares y cáncer. La gran comorbilidad asociada de este grupo de pacientes apoya la necesidad de realizar un seguimiento clínico estrecho.

A pesar de la alta efectividad de los antivirales de acción directa para el tratamiento del VHC, la disponibilidad de estrategias de control de la infección nosocomial y la mejora de los métodos diagnósticos, existe aún una gran desigualdad en la disponibilidad y el acceso al tratamiento, prevención y diagnóstico de estas infecciones <sup>172,173 174 175</sup>.

Por ello, nuestro segundo estudio <sup>176</sup> se enfocó en la validación de las muestras de sangre seca recogidas en TSP para el diagnóstico de las hepatitis virales crónicas. Globalmente, los resultados del estudio muestran una alta fiabilidad de las muestras de sangre seca en TSP para el diagnóstico serológico del VHB, VHC y VHD. En general, obtuvimos unas altas correlaciones de los análisis moleculares entre este tipo de muestras (TSP) y las convencionales de punción venosa. Sin embargo, hubo una diferencia media de 1 logaritmo entre las dos técnicas, siendo inferior en las muestras de sangre seca en TSP. Este hecho es consecuencia del volumen final obtenido en las dos muestras, existiendo un efecto de dilución en las muestras de sangre seca tras su recuperación de las TSP. Como resultado, la sensibilidad de las muestras de sangre seca en TSP con muestras con cargas virales inferiores a 1000 UI/mL ( $10^3\log$ ) puede verse disminuida <sup>177</sup>.

La sensibilidad y especificidad para los marcadores serológicos del VHB evaluados fue del 98.4% y 96% para el HBsAg y del 95.9% y 100% para los anticuerpos anti-HBc. Los dos resultados falsos negativos del HBsAg correspondieron a muestras con un HBsAg

cuantificado en sangre venosa inferior a 1 UI/mL y carga viral indetectable. Los tres falsos positivos de HBsAg podrían atribuirse a una contaminación de las muestras durante el procesamiento manual de las TSP, durante el almacenamiento, el proceso de secado o el envío al laboratorio de las muestras.

La sensibilidad de la TSP para detectar el ADN-VHB fue baja (53,8 %). Estos resultados contrastan con lo observado en otros estudios como el de Mohamed *et al.* en el que la sensibilidad para la detección del ADN-VHB fue del 100%. Estas diferencias pueden ser explicadas porque en nuestro estudio se incluyeron pacientes con cargas virales más bajas <sup>178</sup>. Por otro lado, no podemos descartar que, dadas las condiciones programáticas de la recogida de las TSP, alguna de nuestras muestras tuviera un volumen insuficiente. Esto explicaría las diferencias de sensibilidad obtenidas en nuestro estudio comparado con los resultados de un estudio realizado en condiciones ideales de laboratorio en el que se describió una sensibilidad de la TSP del 100% en muestras con niveles de ADN-VHB > 1000 UI/ml (Velasquez, F; Rando-Segura, A; Salmeron, P; 2020).

A pesar de que estos resultados pueden ser desalentadores, la baja sensibilidad detectada en nuestro estudio no tendría un impacto en el manejo clínico de los pacientes ya que la detección de pacientes con niveles de ADN-VHB > 2000 o 3.3 log UI/mL (criterio de inicio de tratamiento) fue del 96% con una alta correlación con las muestras de sangre venosa ( $R = 0.95$ ). La alta fiabilidad para el diagnóstico serológico y la gran capacidad para detectar aquellos pacientes tributarios de tratamiento mostrados en este estudio hacen de las TSP una herramienta útil para llevar el diagnóstico de la hepatitis B fuera del ámbito hospitalario, acercarlo a aquellos grupos de riesgo de exclusión y a zonas remotas o con escasos recursos <sup>180</sup>.

Por otro lado, el muestreo de sangre capilar para las TSP tiene una muy buena aceptación en ciertas culturas que desconfían de los procedimientos de extracción de sangre habituales, especialmente cuando se trata del cribado de personas asintomáticas como en el caso de la infección crónica por VHB <sup>181</sup>. Por otra parte, nuestro estudio piloto en Angola ha demostrado la viabilidad de usar las TSP para el diagnóstico en zonas remotas donde los diagnósticos moleculares son inexistentes. A pesar del pequeño tamaño de la muestra y el posible sesgo de inclusión, la prevalencia estimada de HBsAg en Cuba coincide con los datos que sugieren que Angola es un país endémico para la

Hepatitis B. Como era esperable la positividad para el HBsAg fue mayor en jóvenes y la positividad para anti-HBc fue muy elevada (65.5%). Un 60% de los pacientes presento viremia detectable por TSP, resultado similar a la sensibilidad global obtenida en el estudio de validación realizado en Vall Hebron (53.8%). A pesar de que los factores de riesgo para la transmisión de hepatitis virales fueron frecuentes no se detectaron infecciones por VHC ni tampoco anti-VHD en los pacientes HBsAg positivos. Este hecho puede ser debido a que el número de individuos estudiados (N=93) fue bajo. Por último, las muestras de sangre seca ya han sido ampliamente utilizadas en muchas áreas del continente africano para el diagnóstico y monitorización del VIH, por lo que su uso para el diagnóstico y monitorización de las hepatitis virales es fácilmente reproducible <sup>182</sup>.

La fiabilidad de las TSP para el diagnóstico del VHC fue elevada obteniendo una sensibilidad y especificidad para la detección de anti-VHC del 98.7% y 100% respectivamente. Sólo obtuvimos un resultado falso negativo que resultó ser una muestra de un paciente no virémico que presentaba unos títulos bajos de anticuerpos frente al VHC, hecho común en los pacientes con una infección resuelta. Al contrario que con el VHB, la sensibilidad de las muestras de sangre seca en TSP para el diagnóstico del ARN-VHC fue del 100% con una alta correlación ( $R=0.98$ ) con las muestras de sangre venosa. Estos resultados concuerdan completamente con los primeros datos obtenidos del diagnóstico del VHC con TSP <sup>177</sup>. A diferencia de los pacientes VHB con HBeAg negativo, las cargas virales de los pacientes con infección crónica por VHC suelen ser estables entorno a  $4-8 \log_{10}$  UI/mL en pacientes no tratados estimándose que únicamente un 1% de los pacientes VHC virémicos presentan niveles de ARN-VHC menores a  $3 \log_{10}$  UI/mL <sup>183</sup>. A pesar de que no incluimos ningún paciente con carga viral menor a  $3 \log_{10}$  UI/mL, podemos asumir que en general, la TSP es una buena herramienta para el diagnóstico virológico del VHC. Por último, las muestras de sangre seca también han demostrado ser útiles para el seguimiento de los pacientes tratados con AAD. En este sentido, resultados de seguimiento de una cohorte de pacientes UDVP con VHC ha observado una buena correlación de las muestras de sangre seca con las muestras de sangre capilar procesadas en Xpert HCV VL-FS. Además, mediante el genotipado de las distintas muestras de sangre seca se ha podido diferenciar las reinfecciones de los fracasos terapéuticos o recaídas <sup>184</sup>.

La sensibilidad para el diagnóstico serológico de la hepatitis D (anti-VHD) fue del 84.6%, ligeramente inferior a otro estudios con muestras de sangre seca <sup>185</sup>. Los dos falsos negativos eran pacientes no virémicos. El ARN-VHD mediante TSP fue detectado en un 70% de los pacientes con viremia detectable en sangre venosa, pero con una alta correlación entre las dos muestras ( $R=0.96$ ). Esta baja sensibilidad puede ser parcialmente debida al uso de una técnica PCR propia del laboratorio con límite inferior de detección de  $5.75 \times 10^2$  UI/mL, así como al efecto de dilución de la muestra debido a su procesado previo como se ha indicado en el apartado correspondiente. No podemos olvidar que en esta técnica el volumen efectivo puede ser de casi 1/5 parte del volumen que se procesa en las muestras venosas.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones como son la falta de determinación del HBeAg en TSP, la baja representatividad de pacientes HBeAg y anti-HDV positivos y la ausencia de pacientes con infección por VHC con baja viremia. La principal limitación de las muestras de sangre en TSP es su baja sensibilidad para detectar cargas virales menores de 1000 UI/mL por los motivos previamente aludidos: menor volumen de sangre utilizado y el efecto dilutorio de su procesado, a pesar de utilizarse un método analítico de la máxima sensibilidad (del orden de 10 UI/mL). Hasta la fecha, se recomienda procesar las muestras de sangre en TSP como máximo a las tres semanas desde su recogida <sup>177</sup>. La estabilidad del material genético dentro de este tiempo parece ser casi completa si bien no se han realizado estudios para evaluar su estabilidad a más largo plazo. Por último, el mayor coste de las TSP frente a otros papeles secantes puede limitar su uso a corto plazo tal y como demuestra una evaluación de la TSP frente a otros dispositivos de papel secante para almacenar sangre seca <sup>145</sup>. No obstante, se debe tener en cuenta que las TSP permiten procesar plasma que es el espécimen para el cual las técnicas analíticas están estandarizadas mientras que los demás dispositivos fijan toda la sangre, incluyendo la fracción celular con presencia alta de hemoglobina por la lisis de los hematíes fijados lo que puede producir artefactos y no permite la garantía de los resultados.

El tercer estudio <sup>186</sup> tuvo como objetivo implementar y evaluar la coste-efectividad de un proyecto de recuperación de pacientes con VHC perdidos en el seguimiento. La estrategia ReLink-C permitió identificar a un porcentaje considerable de pacientes no tratados ni vinculados al sistema sanitario, facilitándoles el acceso a la atención sanitaria.

Con este tipo de proyectos podemos prevenir complicaciones derivadas de la historia natural de la infección por VHC, la mortalidad y reducir la transmisión contribuyendo así a la eliminación del VHC. En total se detectaron 1591 pruebas positivas de ARN-VHC en el laboratorio del Hospital Universitario Vall Hebron desde la implementación de la carga viral refleja.

Ciento sesenta y seis pacientes fueron candidatos a ser recuperados, 51 acudieron a la primera visita de evaluación y finalmente 41, un 2.5% de los pacientes iniciales fueron tratados y curados. El porcentaje de pacientes tratados con esta estrategia fue ligeramente superior al encontrado en el estudio de Utrecht (2.2%) donde únicamente contactaron con los pacientes por medio de correo ordinario. Esta estrategia de recuperación de pacientes se ha replicado en varios países del mundo. Un proyecto realizado en Toulouse y Bordeaux, en el que se realizó la misma estrategia, pero contactando también con los responsables de los pacientes a nivel de la atención primaria, describió unas tasas de tratamiento superiores (7—8%) si bien, la recuperación de pacientes se basó en datos del 2013 al 2017, una época en la que el tratamiento del VHC aún no estaba ampliamente disponible. A pesar de ello, la colaboración de la atención primaria puede tener un papel fundamental en la recuperación de estos pacientes, especialmente en población inmigrante <sup>187</sup>. Uno de los mayores estudios de recuperación se ha realizado en Taiwán. Este proyecto consiguió realizar tratamiento a 323 (2.7%) pacientes con VHC a partir de datos de pacientes anti-VHC positivos. En Holanda, se realizó un proyecto de recuperación de pacientes VHB y VHC con resultados interesantes. Si bien la tasa de tratamiento del VHC fue baja (0.6%), un 9.6% de los pacientes con VHB se evaluaron requiriendo cambios en el tratamiento en un 44% de los pacientes evaluados <sup>188</sup>.

La estrategia utilizada en nuestro estudio tiene varios puntos fuertes. En primer lugar, el uso de la carga refleja en el laboratorio ha facilitado realizar un primer cribado y facilitar la selección de pacientes virémicos. El laboratorio del hospital Vall d'Hebron atiende a la totalidad de la población de la ciudad de Barcelona bajo cobertura sanitaria pública, lo que representa 1.5 millones de personas y tiene implementada esta estrategia de carga refleja desde 2019 <sup>157</sup>. La realización de la carga refleja en los laboratorios se ha visto útil para no perder pacientes y evitar tener que solicitar nuevas muestras de sangre. Su implementación en los principales centros hospitalarios de España ha pasado de un 31%

en 2017 a un 89% en 2019<sup>189</sup> por lo que replicar la estrategia ReLink-C en España es factible. En segundo lugar, el modelo asistencial simplificado para evaluar el grado de enfermedad hepática utilizado. En una única visita presencial se realizó la evaluación clínica, se realizó la extracción sanguínea para la determinación del VHC y se evaluó el estadio de fibrosis mediante ET hepática. Permitiendo contactar con el paciente para iniciar tratamiento con AAD habitualmente en menos de 72h, disminuyendo así el riesgo de pérdidas. De este modo, 41 de los 43 pacientes que acudieron a la visita iniciaron tratamiento (>95%).

Un hallazgo particular de este estudio es que durante el periodo de la pandemia por COVID-19, se vinculó a un menor porcentaje de pacientes y, en consecuencia, se seleccionaron más pacientes para la recuperación. No obstante, el porcentaje de candidatos a contactar fue inferior en el periodo del COVID-19 debido a un mayor porcentaje de pacientes con comorbilidades o esperanza de vida limitada que contraindicaban o limitaban el inicio de tratamiento con AAD (33% vs 54%). Durante la pandemia un ligero porcentaje mayor de pacientes fue localizado (65% vs 62%) y un mayor número de pacientes localizados acudió a la cita médica (88% vs 41%) probablemente en relación a las restricciones de movilidad derivadas de las medidas de emergencia implementadas por el gobierno.

Otra de los puntos fuertes del estudio fue la realización del análisis de coste-efectividad. La estrategia ReLink-C mostró un ahorro global de 456.796 € para el sistema público de salud debido a las reducciones estimadas en la incidencia de complicaciones derivadas de la enfermedad hepática y trasplantes hepáticos.

Una de las limitaciones de nuestro estudio fue la dificultad en contactar con un gran porcentaje de pacientes de los que no se disponía de una información de contacto certera. Además, la amplia zona geográfica cubierta por el laboratorio y la falta de un sistema informático unificado en la región (centros de atención primaria, hospitales, centros de drogodependencia) dificultaron o imposibilitaron el acceso a los datos de contacto en muchos casos. Asimismo, y a pesar de que no se midió el impacto, la barrera idiomática encontrada en muchos casos de pacientes inmigrantes, principalmente de Pakistán y Europa del este, representó una barrera importante. Una buena opción para

mejorar esta estrategia sería la incorporación al equipo de traductores o agentes comunitarios naturales de estas regiones.

Desde el punto de vista individual, la vinculación a la atención sanitaria con esta estrategia permitió facilitar el acceso al tratamiento con AAD. Desde el punto de vista de salud pública, la estrategia contribuyó a la eliminación del VHC y su transmisión. Aunque la pandemia de COVID-19 tuvo un impacto relevante en la vinculación a la atención y el tratamiento, mediante la estrategia ReLink-C se recuperó y trató a un número considerable de pacientes que antes estaban perdidos y demostró ser una estrategia rentable en un sistema sanitario universal y público.

## 7. Conclusiones

- La curación de la infección crónica por el virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa en pacientes con insuficiencia renal avanzada no se asocia con una mejoría de la función renal a largo plazo, si bien podría tener un impacto en pacientes con menor grado de disfunción renal.
- Las complicaciones hepáticas tras el tratamiento o eliminación del virus de la hepatitis C con antivirales de acción directa son infrecuentes en los pacientes que además presentan enfermedad renal crónica, a pesar de ello, la mortalidad sigue siendo elevada, especialmente por eventos cardiovasculares y neoplasias.
- La tarjeta de separación de plasma es una herramienta diagnóstica fiable para el diagnóstico serológico y virológico de las hepatitis virales. Su uso es factible para realizar el diagnóstico en zonas con bajos recursos, así como en individuos de riesgo y aquellos sin vinculación con el sistema sanitario.
- La fiabilidad de la tarjeta de separación de plasma para el diagnóstico virológico en pacientes con bajas cargas virales es menor. A pesar de ello, no influye significativamente en la indicación de tratamiento para los pacientes con infección crónica por VHB.
- La estrategia ReLink-C permitió recuperar y tratar un buen número de pacientes con hepatitis C virémicos perdidos en el seguimiento.
- La estrategia ReLink-C demostró ser coste-efectiva. Reproducir o escalar esta estrategia a nivel nacional podría contribuir a la eliminación de la hepatitis C.



## 8. Líneas de futuro: Hacia la eliminación de las hepatitis virales crónicas

Las necesidades y estrategias para alcanzar la eliminación de las hepatitis virales difieren sustancialmente según las regiones o países. Además, existen considerables diferencias en las intervenciones necesarias para la eliminación de ambas infecciones puesto que existe vacuna para prevenir la hepatitis B, pero no la C y una cura para la hepatitis C, pero no para la B. Por ello es fundamental adaptar las estrategias a los diferentes contextos y necesidades <sup>190</sup>.

Datos recientes apuntan a una disminución mundial de la prevalencia de la infección crónica por VHC desde 2015 hasta 2020. Esto es debido en gran medida al tratamiento en masa realizado en algunos países con alta prevalencia. A pesar de este dato esperanzador, existe un incremento de la incidencia de la infección en países como EE. UU y se ha estimado que solo 12.9 de los 56.8 millones de pacientes virémicos han sido diagnosticados a nivel mundial. Además, se espera una reducción en el número de tratamientos iniciados en los próximos años, estimándose que si el inicio de tratamiento se mantiene inferior al millón de casos anuales, las muertes y complicaciones derivadas del VHC aumentarán para 2030 <sup>51</sup>. En el caso de la hepatitis B, los esfuerzos para alcanzar la eliminación pasan principalmente por mejorar el acceso a la vacunación y la prevención de la transmisión vertical. De hecho, la combinación de la vacunación neonatal y la prevención de la transmisión materno-infantil es la estrategia con mayor probabilidad de alcanzar los objetivos para 2030. A pesar de ello, el aumento del diagnóstico y la vinculación para recibir tratamiento parecen clave en el control de la infección dado el gran número de pacientes portadores del HBsAg <sup>191</sup>.

En resumen, la eliminación de las hepatitis virales crónicas con mayor morbimortalidad (VHC y VHB) parece factible sobre el papel a pesar de que es probable que los objetivos marcados a nivel mundial no se cumplan en 2030.



## 9. Referencias bibliográficas

1. Chatziprodromidou IP, Dimitrakopoulou ME, Apostolou T, Katopodi T, Charalambous E, Vantarakis A. Hepatitis A and E in the Mediterranean: A systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2022;47. doi:10.1016/J.TMAID.2022.102283
2. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol.* 2018;68(1):167-184. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.034
3. Beauté J, Westrell T, Schmid D, et al. Travel-associated hepatitis A in Europe, 2009 to 2015. *Euro Surveill.* 2018;23(22). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.22.1700583
4. Llaneras J, Riveiro-Barciela M, Rando-Segura A, et al. Etiologies and Features of Acute Viral Hepatitis in Spain. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(5):1030-1037. doi:10.1016/j.cgh.2020.07.006
5. Abutaleb A, Kottilil S. Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. doi:10.1016/j.gtc.2020.01.002
6. Cortese MF, Riveiro-Barciela M, Tabernero D, et al. Standardized Hepatitis B Virus RNA Quantification in Untreated and Treated Chronic Patients: a Promising Marker of Infection Follow-Up. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2). doi:10.1128/spectrum.02149-21
7. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015;479-480:672-686. doi:10.1016/J.VIROL.2015.02.031
8. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol.* 2016;64(1):S4-S16. doi:10.1016/J.JHEP.2016.01.027
9. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016;64(1):S84-S101. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.021
10. Myint A, Tong MJ, Beaven SW. Reactivation of Hepatitis B Virus: A Review of Clinical Guidelines. *Clin Liver Dis.* 2020;15(4):162-167. doi:10.1002/CLD.883
11. Liu Z, Zhang Y, Xu M, Li X, Zhang Z. Distribution of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Med (United States).* 2021;100(50):E27941. doi:10.1097/MD.00000000000027941
12. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, et al. Hepatitis B virus infection: Precore

- mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995;22(6):1641-1647. doi:10.1016/0270-9139(95)90185-X
13. Sheena BS, Hiebert L, Han H, et al. Global, regional, and national burden of hepatitis B, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(9):796-829. doi:10.1016/S2468-1253(22)00124-8
  14. Sharma S, Carballo M, Feld JJ, Janssen HLA. Immigration and viral hepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(2):515-522. doi:10.1016/j.jhep.2015.04.026
  15. Thijssen M, Lemey P, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Mass migration to Europe: an opportunity for elimination of hepatitis B virus? *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(4):315-323. doi:10.1016/S2468-1253(19)30014-7
  16. Lu Y, Song Y, Zhai X, et al. Maternal hepatitis B e antigen can be an indicator for antiviral prophylaxis of perinatal transmission of hepatitis B virus. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):555-564. doi:10.1080/22221751.2021.1899055
  17. Tran TT, Gordon SC, Fung S, et al. Hepatitis B e antigen status and hepatitis B DNA levels in women of childbearing age with chronic hepatitis B infection screening for clinical trials. *PLoS One*. 2015;10(3):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0121632
  18. Indolfi G, Easterbrook P, Dusheiko G, et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(6):466-476. doi:10.1016/S2468-1253(19)30042-1
  19. World Health Organization. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 – Recommendations. *Vaccine*. 2019;37(2):223-225. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.046
  20. Spearman CW, Afihene M, Ally R, et al. Hepatitis B in sub-Saharan Africa: strategies to achieve the 2030 elimination targets. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(12):900. doi:10.1016/S2468-1253(17)30295-9
  21. Bassoum O, Kimura M, Dia AT, Lemoine M, Shimakawa Y. Coverage and timeliness of birth dose vaccination in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *Vaccines*. 2020;8(2):1-16. doi:10.3390/vaccines8020301
  22. Fanning GC, Zoulim F. virus infection : towards a cure. *Nat Rev Drug Discov*. 2. doi:10.1038/s41573-019-0037-0
  23. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. Published online 2017.

- doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021
- 24. Ji DZ, Pang XY, Shen DT, Liu SN, Goyal H, Xu HG. Global prevalence of occult hepatitis B: A systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2022;29(5):317-329. doi:10.1111/JVH.13660
  - 25. Berzigotti A, Governing Board representative E, Tsochatzis E, et al. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update. Published online 2021. doi:10.1016/j.jhep.2021.05.025
  - 26. Li Y, Huang YS, Wang ZZ, et al. Systematic review with meta-analysis: The diagnostic accuracy of transient elastography for the staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(4):458-469. doi:10.1111/apt.13488
  - 27. Li Q, Chen L, Zhou Y. Diagnostic accuracy of liver stiffness measurement in chronic hepatitis B patients with normal or mildly elevated alanine transaminase levels. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-7. doi:10.1038/s41598-018-23646-2
  - 28. Papatheodoridis G V., Manolakopoulos S, Liaw YF, Lok A. Follow-up and indications for liver biopsy in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: A systematic review. *J Hepatol.* 2012;57(1):196-202. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.030
  - 29. Yeo YH, Ho HJ, Yang HI, et al. Factors Associated With Rates of HBsAg Seroclearance in Adults With Chronic HBV Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2019;156(3):635-646.e9. doi:10.1053/j.gastro.2018.10.027
  - 30. Raffetti E, Fattovich G, Donato F. Incidence of hepatocellular carcinoma in untreated subjects with chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2016;36(9):1239-1251. doi:10.1111/liv.13142
  - 31. Hsu YC, Yeh ML, Wong GLH, et al. Incidences and Determinants of Functional Cure During Entecavir or Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B. *J Infect Dis.* 2021;224(11):1890-1899. doi:10.1093/infdis/jiab241
  - 32. Sonneveld MJ, Chiu SM, Park JY, et al. Probability of HBsAg loss after nucleo(s)tide analogue withdrawal depends on HBV genotype and viral antigen levels. *J Hepatol.* 2022;76(5):1042-1050. doi:10.1016/j.jhep.2022.01.007
  - 33. Buti M, Roade L, Riveiro-Barciela M, Esteban R. Optimal management of chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide analogues. *Liver Int.* 2020;40(S1):15-

21. doi:10.1111/liv.14367
34. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland P V. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N Engl J Med.* 1975;292(15):767-770. doi:10.1056/nejm197504102921502
35. Alter HJ, Holland P V., Purcell RH, Popper H. Transmissible Agent in Non-a, Non-B Hepatitis. *Lancet.* 1978;311(8062):459-463. doi:10.1016/S0140-6736(78)90131-9
36. Choo Q-L. Melefors and A. von Gabain, ibid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;241(9):13135. www.sciencemag.org
37. Kuo AG, Choo Q, Alter HJ, et al. An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A , Non-B Hepatitis Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1703267> REFERENCES Linked references are available. *Science (80- ).* 1989;244(4902):362-364.
38. Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet.* 2019;394(10207):1451-1466. doi:10.1016/S0140-6736(19)32320-7
39. Yeung CY, Lee HC, Chan WT, Jiang C Bin, Chang SW, Chuang CK. Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives. *World J Hepatol.* 2014;6(9):643-651. doi:10.4254/wjh.v6.i9.643
40. Page K, Melia MT, Veenhuis RT, et al. Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med.* 2021;384(6):541-549. doi:10.1056/NEJMoa2023345
41. Trickey A, Fraser H, Lim AG, et al. The contribution of injection drug use to hepatitis C virus transmission globally, regionally, and at country level: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019;4(6):435-444. doi:10.1016/S2468-1253(19)30085-8
42. Jin F, Dore GJ, Matthews G, et al. Prevalence and incidence of hepatitis C virus infection in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2021;6(1):39-56. doi:10.1016/S2468-1253(20)30303-4
43. Damascene Makuza J, Nisingizwe MP, Olivier J, et al. Role of unsafe medical practices and sexual behaviours in the hepatitis B and C syndemic and HIV co-infection in Rwanda: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2020;10:36711. doi:10.1136/bmjopen-2019-036711

44. WHO. Hepatitis-C @ [www.Who.Int](http://www.who.int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Hepatitis-C). <Https://WwwWhoInt/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Hepatitis-C>. Published online 2020. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
45. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016;22(34):7824-7840. doi:10.3748/wjg.v22.i34.7824
46. WHO. World Health Organization; Geneva: 2016. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021.
47. Hoenigl M, Abramovitz D, Flores Ortega RE, Martin NK, Reau N. Clinical Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. Published online 2022. doi:10.1093/cid/ciac175
48. Strickland GT. Liver disease in Egypt: Hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*. 2006;43(5):915-922. doi:10.1002/hep.21173
49. Graham CS. The Current Status of US and Global Access to Direct-Acting Antiviral Regimens for Hepatitis C Virus Infection. *Clin Liver Dis.* 2020;16(1):16-19. doi:10.1002/cld.925
50. Sulkowski M, Cheng WH, Marx S, Sanchez Gonzalez Y, Strezewski J, Reau N. Estimating the Year Each State in the United States Will Achieve the World Health Organization's Elimination Targets for Hepatitis C. *Adv Ther.* 2021;38(1):423-440. doi:10.1007/s12325-020-01535-3
51. John F, Foundation CM, Sciences G, Foundation Z. Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022;7(5):396-415. doi:10.1016/S2468-1253(21)00472-6
52. Pawlotsky JM, Negro F, Aghemo A, et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol.* 2020;73(5):1170-1218. doi:10.1016/j.jhep.2020.08.018
53. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):47-52. doi:10.7150/ijms.3.47
54. Rao A, Rule JA, Cerro-Chiang G, et al. Role of Hepatitis C Infection in Acute Liver Injury/Acute Liver Failure in North America. *Dig Dis Sci.* 2023;68(1). doi:10.1007/S10620-022-07524-6

55. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2014;59(1):109-120. doi:10.1002/HEP.26639
56. Martinello M, Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ, Matthews G V. Management of acute HCV infection in the era of direct-acting antiviral therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(7):412-424. doi:10.1038/s41575-018-0026-5
57. Misra S, Dieterich DT, Saberi B, Kushner T. Direct-acting antiviral treatment of acute hepatitis C virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(8):599-610. doi:10.1080/14787210.2018.1505502
58. Brancaccio G, Sorbo MC, Frigeri F, et al. Treatment of Acute Hepatitis C With Ledipasvir and Sofosbuvir in Patients With Hematological Malignancies Allows Early Re-start of Chemotherapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(6):977-978. doi:10.1016/j.cgh.2017.10.032
59. Deterding K, Spinner CD, Schott E, et al. Ledipasvir plus sofosbuvir fixed-dose combination for 6 weeks in patients with acute hepatitis C virus genotype 1 monoinfection (HepNet Acute HCV IV): an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):215-222. doi:10.1016/S1473-3099(16)30408-X
60. Bethea ED, Chen Q, Hur C, Chung RT, Chhatwal J. Should we treat acute hepatitis C? A decision and cost-effectiveness analysis. *Hepatology*. 2018;67(3):837-846. doi:10.1002/HEP.29611
61. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1):S58-S68. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012
62. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol*. 2003;2(1):5-11. doi:10.1016/s1665-2681(19)32152-0
63. Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 2008;48(2):418-431. doi:10.1002/HEP.22375
64. Wang CC, Morishima C, Chung M, et al. High Serum Hepatitis C Virus (HCV) RNA Load Predicts the Presence of HCV RNA in Saliva from Individuals with Chronic and Acute HCV Infection. Accessed February 21, 2023. <https://academic.oup.com/jid/article/193/5/672/877317>
65. Mutimer D, Aghemo A, Diepolder H, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014;60(2):392-420.

- doi:10.1016/J.JHEP.2013.11.003
66. Pawlotsky J-M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(S1):S65-S73. doi:10.1002/HEP.1840360709
  67. Freiman JM, Tran TM, Schumacher SG, et al. Hepatitis C core antigen testing for diagnosis of hepatitis C virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2016;165(5):345-355. doi:10.7326/M16-0065
  68. Schillie S, Wester C, Osborne M, Wesolowski L, Ryerson AB. CDC Recommendations for Hepatitis C Screening Among Adults — United States, 2020. *MMWR Recomm Reports*. 2020;69(2):1-17. doi:10.15585/MMWR.RR6902A1
  69. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am*. 2015;44(4):717-734. doi:10.1016/j.gtc.2015.07.003
  70. Bedossa P, Poupon T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;24(2):289-293. doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008690394
  71. Kim SU, Oh HJ, Wanless IR, Lee S, Han KH, Park YN. The Laennec staging system for histological sub-classification of cirrhosis is useful for stratification of prognosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;57(3):556-563. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.029
  72. Afdhal NH, Bacon BR, Patel K, et al. Accuracy of fibroscan, compared with histology, in analysis of liver fibrosis in patients with hepatitis B or C: a United States multicenter study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):772-779.e3. doi:10.1016/J.CGH.2014.12.014
  73. Martínez-Camprécios J, Bonis Puig S, Pons Delgado M, Salcedo Allende MT, Mínguez Rosique B, Genescà Ferrer J. Transient elastography in DAA era. Relation between post-SVR LSM and histology. *J Viral Hepat*. 2020;27(4):453-455. doi:10.1111/JVH.13245
  74. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128(2):343-350. doi:10.1053/J.GASTRO.2004.11.018
  75. van der Meer AJ, Berenguer M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. *J Hepatol*. 2016;65(1):S95-S108. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.039
  76. Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis*. 2007;16(1):65-73. doi:10.1056/NEJMRA2033539/SUPPL\_FILE/NEJMRA2033539\_DISCLOSURES.

PDF

77. Molnar MZ, Alhourani HM, Wall BM, et al. Association of hepatitis C viral infection with incidence and progression of chronic kidney disease in a large cohort of US veterans. *Hepatology*. 2015;61(5):1495-1502. doi:10.1002/hep.27664
78. Park H, Adeyemi A, Henry L, Stepanova M, Younossi ZM. A meta-analytic assessment of the risk of chronic kidney disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2015;22(11):897-905. doi:10.1111/jvh.12413
79. Pol S, Parlati L, Jadoul M. Hepatitis C virus and the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(2):73-86. doi:10.1038/s41581-018-0081-8
80. Lai TS, Lee MH, Yang HI, et al. High hepatitis C viral load and genotype 2 are strong predictors of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017;92(3):703-709. doi:10.1016/J.KINT.2017.03.021
81. Petta S, Macaluso FS, Craxì A. Cardiovascular diseases and HCV infection: a simple association or more? *Gut*. 2014;63(3):369-375. doi:10.1136/GUTJNL-2013-306102
82. Domont F, Cacoub P. Chronic hepatitis C virus infection, a new cardiovascular risk factor? *Liver Int*. 2016;36(5):621-627. doi:10.1111/LIV.13064
83. McGowan CR, Wright T, Nitsch D, et al. High prevalence of albuminuria amongst people who inject drugs: A cross-sectional study. doi:10.1038/s41598-020-63748-4
84. Stalund I V., Grønseth H, Reinholt FP, Svarstad E, Marti HP, Leh S. Chronic Kidney Disease from Polyvinylpyrrolidone Deposition in Persons with Intravenous Drug Use. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022;17(4):518-526. doi:10.2215/CJN.13681021
85. Strader DB, Seeff LB. A Brief History of the Treatment of Viral Hepatitis C An Official Learning Resource of AASLD. *Clin Liver Dis*. 2012;1(1). doi:10.1002/cld.1
86. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1986;315(25):1575-1578. doi:10.1056/NEJM198612183152503
87. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med*. 1989;321(22):1501-1506. doi:10.1056/NEJM198911303212203
88. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon α2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*.

- 1998;352(9138):1426-1432. doi:10.1016/S0140-6736(98)07124-4
89. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol.* 1993;67(3):1385-1395. doi:10.1128/jvi.67.3.1385-1395.1993
90. Dubuisson J, Fabiani FL. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 2007;13(17):2406-2415. Accessed February 19, 2023. [www.wjgnet.comhttp://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2406.asp](http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2406.asp)
91. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature.* 2003;426(6963):186-189. doi:10.1038/NATURE02099
92. Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology.* 2004;127(5):1347-1355. doi:10.1053/j.gastro.2004.08.002
93. Stanciu C, Muzica CM, Girleanu I, et al. An update on direct antiviral agents for the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother.* 2021;22(13):1729-1741. doi:10.1080/14656566.2021.1921737
94. EASL recommendations on treatment of Hepatitis C 2020 - EASL-The Home of Hepatology. Accessed February 16, 2023. <https://easl.eu/publication/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-c-2020/>
95. Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med.* 2015;373(27):2599-2607. doi:10.1056/nejmoa1512610
96. Bourlière M, Gordon SC, Flamm SL, et al. Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2134-2146. doi:10.1056/nejmoa1613512
97. Asselah T, Marcellin P, Schinazi RF. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver Int.* 2018;38(November 2017):7-13. doi:10.1111/liv.13673
98. Sarrazin C. Treatment failure with DAA therapy: Importance of resistance. *J Hepatol.* 2021;74(6):1472-1482. doi:10.1016/j.jhep.2021.03.004
99. Rockstroh JK, Lacombe K, Viani RM, et al. Efficacy and Safety of Glecaprevir/Pibrentasvir in Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1: The EXPEDITION-2 Study. *Clin Infect Dis.*

2018;67(7):1010-1017. doi:10.1093/cid/ciy220

100. El-Sherif O, Khoo S, Solas C. Key drug-drug interactions with direct-acting antiviral in HIV-HCV coinfection. *Curr Opin HIV AIDS.* 2015;10(5):348-354. doi:10.1097/COH.0000000000000185
101. Bunchorntavakul C, Maneerattanaporn M, Chavalitdhamrong D. Management of patients with hepatitis C infection and renal disease. *World J Hepatol.* 2015;7(2):213-225. doi:10.4254/wjh.v7.i2.213
102. Pockros PJ, Reddy KR, Mantry PS, et al. Efficacy of Direct-Acting Antiviral Combination for Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection and Severe Renal Impairment or End-Stage Renal Disease. *Gastroenterology.* 2016;150(7):1590-1598. doi:10.1053/J.GASTRO.2016.02.078
103. Londoño MC, Riveiro-Barciela M, Ahumada A, et al. Effectiveness, safety/tolerability of OBV/PTV/r ± DSV in patients with HCV genotype 1 or 4 with/without HIV-1 co-infection, chronic kidney disease (CKD) stage IIIb-V and dialysis in Spanish clinical practice-Vie-KinD study. *PLoS One.* 2019;14(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0221567
104. Bruchfeld A, Roth D, Martin P, et al. Elbasvir plus grazoprevir in patients with hepatitis C virus infection and stage 4–5 chronic kidney disease: clinical, virological, and health-related quality-of-life outcomes from a phase 3, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(8):585-594. doi:10.1016/S2468-1253(17)30116-4
105. Gane E, Lawitz E, Pugatch D, et al. Glecaprevir and Pibrentasvir in Patients with HCV and Severe Renal Impairment. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1448-1455. doi:10.1056/NEJMoa1704053
106. Cacoub P, Desbois AC, Isnard-Bagnis C, Rocatello D, Ferri C. Hepatitis C virus infection and chronic kidney disease: Time for reappraisal. *J Hepatol.* 2016;65(1):S82-S94. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.011
107. Pawlotsky J-M, Negro F, Aghemo A, et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018 q. Published online 2018. doi:10.1016/j
108. Borgia SM, Dearden J, Yoshida EM, et al. Sofosbuvir/velpatasvir for 12 weeks in hepatitis C virus-infected patients with end-stage renal disease undergoing dialysis. *J Hepatol.* 2019;71(4):660-665. doi:10.1016/j.jhep.2019.05.028
109. Sise ME, McQuaid T, Martin P. Sofosbuvir-based hepatitis C therapies in patients with chronic and end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.*

2022;37(12):2327-2334. doi:10.1093/NDT/GFAB072

110. Mendizabal M, Piñero F, Ridruejo E, et al. Disease Progression in Patients With Hepatitis C Virus Infection Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(11):2554-2563.e3. doi:10.1016/j.cgh.2020.02.044
111. Krassenburg LAP, Maan R, Ramji A, et al. Clinical outcomes following DAA therapy in patients with HCV-related cirrhosis depend on disease severity. *J Hepatol*. 2021;74(5):1053-1063. doi:10.1016/j.jhep.2020.11.021
112. Verna EC, Morelli G, Terrault NA, et al. *DAA Therapy and Long-Term Hepatic Function in Advanced/Decompensated Cirrhosis: Real-World Experience from HCV-TARGET Cohort*. Vol 73. European Association for the Study of the Liver; 2020. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.031
113. Pascasio JM, Vinaixa C, Ferrer MT, et al. Clinical outcomes of patients undergoing antiviral therapy while awaiting liver transplantation. *J Hepatol*. 2017;67(6):1168-1176. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.008
114. Calvaruso V, Craxi A. Hepatic benefits of HCV cure. Published online 2020. doi:10.1016/j.jhep.2020.08.006
115. Cacoub P, Nafa Si Ahmed S, Ferfar Y, et al. Long-term Efficacy of Interferon-Free Antiviral Treatment Regimens in Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cryoglobulinemia Vasculitis. Published online 2019. doi:10.1016/j.cgh.2018.05.021
116. Rutledge SM, Chung RT, Sise ME. Treatment of hepatitis C virus infection in patients with mixed cryoglobulinemic syndrome and cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Hemodial Int*. 2018;22(Table 1):S81-S96. doi:10.1111/hdi.12649
117. Aby ES, Dong TS, Kawamoto J, Piseagna JR, Benhammou JN. Impact of sustained virologic response on chronic kidney disease progression in hepatitis C. *World J Hepatol*. 2017;9(36):1352-1360. doi:10.4254/wjh.v9.i36.1352
118. Coppola N, Portunato F, Buonomo AR, et al. Interferon-free regimens improve kidney function in patients with chronic hepatitis C infection. *J Nephrol*. 2019;32(5):763-773. doi:10.1007/s40620-019-00608-z
119. Hsu YC, Ho HJ, Huang YT, et al. Association between antiviral treatment and extrahepatic outcomes in patients with hepatitis C virus infection. *Gut*. 2015;64(3):495-503. doi:10.1136/gutjnl-2014-308163
120. Mahale P, Engels EA, Li R, et al. The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Gut*.

- 2018;67(3):553 LP - 561. doi:10.1136/gutjnl-2017-313983
121. Ogawa E, Chien N, Kam L, et al. Association of Direct-Acting Antiviral Therapy With Liver and Nonliver Complications and Long-term Mortality in Patients With Chronic Hepatitis C. *JAMA Intern Med.* 2023;183(2):97-105. doi:10.1001/JAMAINTERNMED.2022.5699
  122. Casey JL. Control of ADAR1 Editing of Hepatitis Delta Virus RNAs. *Casey JL Control ADAR1 Ed Hepat delta virus RNAs Curr Top Microbiol Immunol* 2012;353:123-143 doi:10.1007/82\_2011\_146. 2012;353(January):123-143. doi:10.1007/82
  123. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet.* 2011;378(9785):73-85. doi:10.1016/S0140-6736(10)61931-9
  124. Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MYR, De Martel C, Hutin Y, Geretti AM. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis Graphical abstract. *J Hepatol.* 2020;73:523-532. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.008
  125. Yurdaydin C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat.* 2010;17(11):749-756. doi:10.1111/J.1365-2893.2010.01353.X
  126. Wranke A, Serrano BC, Heidrich B, et al. Antiviral treatment and liver-related complications in hepatitis delta. *Hepatology.* 2017;65(2):414-425. doi:10.1002/HEP.28876
  127. Zöllner C, Hofmann J, Lutz K, Tacke F, Demir M. Real-life experiences with bulevirtide for the treatment of hepatitis delta—48 weeks data from a German centre. *Liver Int.* 2022;42(11):2403-2407. doi:10.1111/LIV.15408
  128. Wedemeyer H, Schöneweis K, Bogomolov P, et al. Safety and efficacy of bulevirtide in combination with tenofovir disoproxil fumarate in patients with hepatitis B virus and hepatitis D virus coinfection (MYR202): a multicentre, randomised, parallel-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2023;23(1):117-129. doi:10.1016/S1473-3099(22)00318-8
  129. Lampertico P, Roulot D, Wedemeyer H. Bulevirtide with or without pegIFN $\alpha$  for patients with compensated chronic hepatitis delta: From clinical trials to real-world studies. *J Hepatol.* 2022;77(5):1422-1430. doi:10.1016/j.jhep.2022.06.010
  130. Wedemeyer H, Aleman S, Brunetto MR, et al. A Phase 3, Randomized Trial of Bulevirtide in Chronic Hepatitis D. *N Engl J Med.* Published online 2023.

doi:10.1056/nejmoa2213429

131. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55(4):988-997. doi:10.1002/hep.25505
132. Kamar N, Izopet J, Pavio N, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.86
133. Riveiro-Barciela M, Sauleda S, Quer J, et al. Red blood cell transfusion-transmitted acute hepatitis E in an immunocompetent subject in Europe: a case report. *Transfusion*. 2017;57(2):244-247. doi:10.1111/trf.13876
134. Bergløv A, Hallager S, Weis N. Hepatitis E during pregnancy: Maternal and foetal case-fatality rates and adverse outcomes-A systematic review. *J Viral Hepat*. 2019;26(11):1240-1248. doi:10.1111/JVH.13129
135. Kumar A, Saraswat VA. Hepatitis E and Acute-on-Chronic Liver Failure. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3(3):225-230. doi:10.1016/J.JCEH.2013.08.013
136. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, et al. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 2008;358(8):811-817. doi:10.1056/nejmoa0706992
137. Dalton HR, Kamar N, Baylis SA, Moradpour D, Wedemeyer H, Negro F. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol*. 2018;68(6):1256-1271. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.005
138. Wu X, Chen P, Lin H, Hao X, Liang Z. Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2603. doi:10.1080/21645515.2016.1184806
139. Khuroo MS, Khuroo NS, Khuroo MS. Accuracy of Rapid Point-of-Care Diagnostic Tests for Hepatitis B Surface Antigen-A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(3):226-240. doi:10.1016/j.jceh.2014.07.008
140. Vetter BN, Reipold EI, Ongarello S, et al. Sensitivity and Specificity of Rapid Diagnostic Tests for Hepatitis C Virus With or Without HIV Coinfection: A Multicentre Laboratory Evaluation Study. *J Infect Dis*. 2022;226(3):420-430. doi:10.1093/infdis/jiaa389
141. Abravanel F, Lhomme S, Trémeaux P, et al. Performance of the Xpert HBV Viral Load assay versus the Aptima Quant assay for quantifying hepatitis B virus DNA. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(2):114946. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2019.114946

142. Mohamed Z, Mbwambo J, Rwegasha J, et al. In-field evaluation of Xpert® HCV viral load Fingerstick assay in people who inject drugs in Tanzania. *Liver Int.* 2020;40(3):514-521. doi:10.1111/liv.14315
143. Arredondo M, Garrido C, Parkin N, et al. Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbott real-time viral load assay. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):569-572. doi:10.1128/JCM.00418-11
144. Lange B, Cohn J, Roberts T, et al. Diagnostic accuracy of serological diagnosis of hepatitis C and B using dried blood spot samples (DBS): Two systematic reviews and meta-analyses. *BMC Infect Dis.* 2017;17(Suppl 1). doi:10.1186/s12879-017-2777-y
145. Nichols BE, Girdwood SJ, Shibemba A, et al. Cost and Impact of Dried Blood Spot Versus Plasma Separation Card for Scale-up of Viral Load Testing in Resource-limited Settings. *Clin Infect Dis.* 2020;70(6):1014-1020. doi:10.1093/cid/ciz338
146. Prugger C, Laperche S, Murphy EL, et al. Screening for transfusion transmissible infections using rapid diagnostic tests in Africa: A potential hazard to blood safety? *Vox Sang.* 2016;110(2):196-198. doi:10.1111/vox.12327
147. World Health Organization. *Global Status Report on Blood Safety and Availability, 2016.*; 2016.
148. Mason LMK, Veldhuijzen IK, Duffell E, et al. Hepatitis B and C testing strategies in healthcare and community settings in the EU / EEA: A systematic review. 2019;(May):1431-1453. doi:10.1111/jvh.13182
149. Kracht PAM, Arends JE, van Erpecum KJ, et al. REtrieval And cure of Chronic Hepatitis C (REACH): Results of micro-elimination in the Utrecht province. *Liver Int.* 2019;39(3):455-462. doi:10.1111/liv.13959
150. Giuliani R, Casigliani V, Fornili M, et al. HCV micro-elimination in two prisons in Milan, Italy: A model of care. *J Viral Hepat.* 2020;27(12):1444-1454. doi:10.1111/jvh.13376
151. Lens S, Miralpeix A, Gálvez M, et al. HCV microelimination in harm reduction centres has benefits beyond HCV cure but is hampered by high reinfection rates. *JHEP Reports.* 2022;4(12). doi:10.1016/j.jhepr.2022.100580
152. Kim JU, Ingiliz P, Shimakawa Y, Lemoine M. Improving care of migrants is key for viral hepatitis elimination in europe. *Bull World Health Organ.* 2021;99(4):280-286. doi:10.2471/BLT.20.260919
153. Kondili LA, Buti M, Riveiro-Barciela M, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on

- hepatitis B and C elimination: An EASL survey. *JHEP Reports*. 2022;4(9):100531. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100531
154. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl.* 2013; 3: 1–150.
155. Velásquez-Orozco F, Rando-Segura A, Martínez-Camprecios J, et al. Utility of the cobas® plasma separation card as a sample collection device for serological and virological diagnosis of hepatitis c virus infection. *Diagnostics*. 2021;11(3):1-10. doi:10.3390/diagnostics11030473
156. Homs M, Giersch K, Blasi M, et al. Relevance of a full-length genomic RNA standard and a thermal-shock step for optimal hepatitis delta virus quantification. Published online 2014. doi:10.1128/JCM.00940-14
157. López-Martínez R, Arias-García A, Rodríguez-Algarra F, et al. Significant improvement in diagnosis of hepatitis C virus infection by a one-step strategy in a central laboratory: An optimal tool for hepatitis C elimination? *J Clin Microbiol*. 2020;58(1). doi:10.1128/JCM.01815-19
158. Turnes J, Domínguez-Hernández R, Casado MÁ. Cost-effectiveness analysis of two treatment strategies for chronic hepatitis C before and after access to direct-acting antivirals in Spain. *Gastroenterol Hepatol*. 2017;40(7):433-446. doi:10.1016/J.GASTROHEP.2017.05.004
159. Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. Published online 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:8<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E
160. Martínez-Campreciós J, Riveiro-Barciela M, Muñoz-Gómez R, et al. Long-term follow-up of HCV-infected patients with end-stage chronic kidney disease after sustained virological response with direct-acting antiviral therapy [published online ahead of print, 2022 Dec 27]. *Gastroenterol Hepatol*. 2022;S0210-5705(22)00313-2. doi:10.1016/j.gastrohep.2022.12.004
161. Fabrizi F, Donato FM, Messa P. Association between hepatitis C virus and chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Ann Hepatol*. 2018;17(3):364-391. doi:10.5604/01.3001.0011.7382
162. Chen CH, Shen CH, Wei KL, et al. Factors Associated with Large Renal Function Decline in Patients with Chronic Hepatitis C Successfully Treated with Direct-Acting Antiviral Therapy. *Diagnostics*. 2023;13(3). doi:10.3390/diagnostics13030473

163. Chiu SM, Tsai MC, Lin CY, et al. Serial changes of renal function after directly acting antivirals treatment for chronic hepatitis C: A 1-year follow-up study after treatment. *PLoS One*. 2020;15(4):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0231102
164. Driedger M, Galanakis C, Cooper C. Direct acting antiviral HCV treatment does not influence renal function. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(22):e20436. doi:10.1097/MD.00000000000020436
165. Nahon P, Layese R, Bourcier V, et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma After Direct Antiviral Therapy for HCV in Patients With Cirrhosis Included in Surveillance Programs. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1436-1450.e6. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.015
166. D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2012;56(2):532-543. doi:10.1002/HEP.25606
167. Piedade J, Pereira G, Guimarães L, et al. Liver stiffness regression after sustained virological response by direct-acting antivirals reduces the risk of outcomes. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-10. doi:10.1038/s41598-021-91099-1
168. Benhammou JN, Moon AM, Pisegna JR, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Risk Factors Affect Liver-Related Outcomes After Direct-Acting Antiviral Treatment for Hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2021;66(7):2394-2406. doi:10.1007/S10620-020-06457-2
169. Neovius M, Jacobson SH, Eriksson JK, Elinder CG, Hylander B. Mortality in chronic kidney disease and renal replacement therapy: a population-based cohort study. *BMJ Open*. 2014;4(2). doi:10.1136/BMJOPEN-2013-004251
170. Goodkin DA, Bragg-Gresham JL, Koenig KG, et al. Association of Comorbid Conditions and Mortality in Hemodialysis Patients in Europe, Japan, and the United States: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3270-3277. doi:10.1097/01.ASN.0000100127.54107.57
171. Lowrance WT, Ordoñez J, Udaltssova N, Russo P, Go AS. CKD and the risk of incident cancer. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(10):2327-2334. doi:10.1681/ASN.2013060604
172. Sonderup MW, Spearman CW. Global Disparities in Hepatitis B Elimination—A Focus on Africa. *Viruses*. 2022;14(1). doi:10.3390/v14010082
173. Spearman CW, Sonderup MW. Health disparities in liver disease in sub-Saharan

- Africa. *Liver Int.* 2015;35(9):2063-2071. doi:10.1111/LIV.12884
- 174. Mitchell T, Nayagam JS, Dusheiko G, Agarwal K. Health inequalities in the management of chronic hepatitis B virus infection in patients from sub-Saharan Africa in high-income countries. *JHEP Reports.* 2023;5(2):100623. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100623
  - 175. Valdiserri RO, Koh HK, Ward JW. Overcome Health Inequities to Eliminate Viral Hepatitis. *Jama.* 2023;329(19):1637-1638. doi:10.1001/jama.2023.5381
  - 176. Martínez-Campreciós J, Rando-Segura A, Buti M, et al. Reflex viral load testing in dried blood spots generated by plasma separation card allows the screening and diagnosis of chronic viral hepatitis. *J Virol Methods.* 2021;289. doi:10.1016/j.jviromet.2020.114039
  - 177. Marins EG, Krey N, Becker A, Melzer S, Hoppler M. Evaluation of the cobas® HCV test for quantifying HCV RNA in dried plasma spots collected using the cobas® Plasma Separation Card. Published online 2020. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113820
  - 178. Mohamed S, Raimondo A, Pénaranda G, et al. Dried Blood Spot Sampling for Hepatitis B Virus Serology and Molecular Testing. *PLoS One.* 2013;8(4):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0061077
  - 179. Velasquez, F; Rando-Segura, A; Salmeron P et al. Evaluation of the whole blood spot on plasma separation card as a sample type for hepatitis B virus viral load quantification on the COBAS 6800 system [Abstract 7401]. *30th ECCMID Congr.* Published online 2020:2020.
  - 180. Picchio CA, Nomah DK, Araujo SG, et al. A novel model of care for simplified testing of HBV in African communities during the COVID-19 pandemic in Spain. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-8. doi:10.1038/s41598-021-96350-3
  - 181. Boahen O, Owusu-Agyei S, Febir LG, et al. Community perception and beliefs about blood draw for clinical research in ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(4):261-265. doi:10.1093/trstmh/trt012
  - 182. Allain JP, Opare-Sem O. Screening and diagnosis of HBV in low-income and middle-income countries. Published online 2016. doi:10.1038/nrgastro.2016.138
  - 183. Rando-Segura A, Buti M, Quer J, López-Martínez R, Rodríguez-Frías F. Viral load measurements in individuals with hepatitis C virus infection: On the European Association for the study of the liver recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J Clin Microbiol.* 2020;58(1):2019-2020. doi:10.1128/JCM.01379-19

184. Not A, Saludes V, Gálvez M, et al. Usefulness of dried blood spot samples for monitoring hepatitis C treatment outcome and reinfection among people who inject drugs in a test-and-treat program. *J Med Virol.* 2023;95(2). doi:10.1002/jmv.28544
185. Jackson K, Holgate T, Tekoaua R, Nicholson S, Littlejohn M, Locarnini S. Evaluation of dried blood spots for hepatitis B and D serology and nucleic acid testing. Published online 2019. doi:10.1002/jmv.25485
186. Vargas-Accarino E, Martínez-Campreciós J, Domínguez-Hernández R, et al. Cost-effectiveness analysis of an active search to retrieve HCV patients lost to follow-up (RELINK-C strategy) and the impact of COVID-19. *J Viral Hepat.* 2022;29(7):579-583. doi:10.1111/jvh.13686
187. O'Donnell CA, Burns N, Mair FS, et al. Reducing the health care burden for marginalised migrants: The potential role for primary care in Europe. *Health Policy (New York).* 2016;120(5):495-508. doi:10.1016/j.healthpol.2016.03.012
188. Beekmans N, Klemt-Kropp M. Re-evaluation of chronic hepatitis B and hepatitis C patients lost to follow-up: results of the Northern Holland hepatitis retrieval project. *Hepatol Med Policy.* 2018;3(1):1-6. doi:10.1186/s41124-018-0032-9
189. Crespo J, Lázaro P, Blasco AJ, et al. Hepatitis C reflex testing in Spain in 2019: A story of success. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2021;39(3):119-126. doi:10.1016/j.eimc.2020.03.004
190. Thomas DL. Global Elimination of Chronic Hepatitis. *N Engl J Med.* 2019;380(21):2041-2050. doi:10.1056/nejmra1810477
191. Buti M, Craxi A, Foster GR, et al. Viral hepatitis elimination: Towards a hepatitis-free world. *J Hepatol.* 2022;77(5):1444-1447. doi:10.1016/j.jhep.2022.06.034

## 10. Anexos

### 10.1 Publicación 1

Martínez-Campreciós J, Riveiro-Barciela M, Muñoz-Gómez R, et al. Long-term follow-up of HCV-infected patients with end-stage chronic kidney disease after sustained virological response with direct-acting antiviral therapy. *Gastroenterol Hepatol*. 2023;46(8):594-602. doi:10.1016/j.gastrohep.2022.12.004



#### ORIGINAL ARTICLE

#### Long-term follow-up of HCV-infected patients with end-stage chronic kidney disease after sustained virological response with direct-acting antiviral therapy

Joan Martínez-Campreciós<sup>a,b</sup>, Mar Riveiro-Barciela<sup>a,b,c,\*</sup>,  
Raquel Muñoz-Gómez<sup>d</sup>, María-Carlota Londoño<sup>c,e</sup>, Mercé Roget<sup>f</sup>,  
Miguel Ángel Serra<sup>g</sup>, Desamparados Escudero-García<sup>g</sup>, Laura Purchades<sup>g</sup>,  
Manuel Rodríguez<sup>h</sup>, Juan E. Losa-García<sup>i</sup>, María L. Gutiérrez<sup>j</sup>, Isabel Carmona<sup>k</sup>,  
Javier García-Samaniego<sup>c,l</sup>, Luís Morano<sup>m,n</sup>, Ignacio Martín-Granizo<sup>o</sup>,  
Marta Montero-Alonso<sup>p</sup>, Martín Prieto<sup>c,q</sup>, Manuel Delgado<sup>r</sup>, Natalia Ramos<sup>s</sup>,  
María A. Azancot<sup>t</sup>, Francisco Rodríguez-Frías<sup>b,c,t</sup>, María Buti<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Liver Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>c</sup> CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Gastroenterology, Hospital General Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Liver Unit, Hospital Clínic/IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Liver Unit, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Digestive Medicine Service, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>h</sup> Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, Spain

<sup>i</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Madrid, Spain

<sup>j</sup> Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Madrid, Spain

<sup>k</sup> Digestive Disease Unit, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain

<sup>l</sup> Liver Unit, Hospital Universitario La Paz/IdiPaz, Madrid, Madrid, Spain

<sup>m</sup> Infectious Disease Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitario Álvaro Cunqueiro, Vigo, Pontevedra, Spain

<sup>n</sup> RIS (Red Española de Investigación en SIDA), Madrid, Spain

<sup>o</sup> Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Álvaro Cunqueiro, Vigo, Pontevedra, Spain

<sup>p</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>q</sup> Liver Transplantation and Hepatology Unit, Hospital Universitari i Politécnic La Fe-IIS, La Fe, Valencia, Spain

<sup>r</sup> Digestive Disease Unit, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

<sup>s</sup> Department of Nephrology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

<sup>t</sup> Liver Pathology Lab, Biochemistry and Microbiology Departments (Clinical Laboratories), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

Received 24 July 2022; accepted 19 December 2022

\* Corresponding author.

E-mail address: [mar.riveiro@gmail.com](mailto:mar.riveiro@gmail.com) (M. Riveiro-Barciela).

<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.12.004>

0210-5705/© 2022 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Please cite this article as: J. Martínez-Campreciós, M. Riveiro-Barciela, R. Muñoz-Gómez et al., Long-term follow-up of HCV-infected patients with end-stage chronic kidney disease after sustained virological response with direct-acting antiviral therapy, *Gastroenterología y Hepatología*, <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.12.004>

This article was published in *Gastroenterología y Hepatología*, Vol 46, Issue 8, Joan Martínez-Campreciós et al, Long-term follow-up of HCV-infected patients with end-stage chronic kidney disease after sustained virological response with direct-acting antiviral therapy, Pages 594-602, Copyright Elsevier (October 2023)

**KEYWORDS**

Hepatitis C;  
Chronic kidney  
disease;  
Direct-acting  
antivirals;  
Kidney  
transplantation

**Abstract**

**Background and aim:** Patients with chronic kidney disease (CKD) and hepatitis C infection can be safely and effectively treated with direct-acting antivirals (DAAs). However, there is scarce data on the long-term impact of hepatitis C cure on CKD. The aim of this study was to assess the long-term mortality, morbidity and hepatic/renal function outcomes in a cohort of HCV-infected individuals with CKD treated with DAAs.

**Methods:** 135 HCV patients with CKD stage 3b-5 who received ombitasvir/paritaprevir/ritonavir±dasabuvir in a multicenter study were evaluated for long-term hepatic and renal outcomes and their associated mortality.

**Results:** 125 patients achieved SVR and 66 were included. Prior to SVR, 53 were under renal replacement therapy (RRT) and 25 (37.8%) had liver cirrhosis. After a follow-up of 4.5 years, 25 (38%) required kidney transplantation but none combined liver-kidney. No changes in renal function were observed among the 51 patients who did not receive renal transplant although eGFR values improved in those with baseline CKD stage 3b-4. Three (5.6%) subjects were weaned from RRT. Eighteen (27.3%) patients died, mostly from cardiovascular events; 2 developed liver decompensation and 1 hepatocellular carcinoma. No HCV reinfection was observed.

**Conclusions:** Long-term mortality remained high among end-stage CKD patients despite HCV cure. Overall, no improvement in renal function was observed and a high proportion of patients required kidney transplantation. However, in CKD stage 3b-4 HCV cure may play a positive role in renal function.

© 2022 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**PALABRAS CLAVE**

Hepatitis C;  
Enfermedad renal  
crónica;  
Antivirales de acción  
directa;  
Trasplante renal

**Seguimiento a largo plazo de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C con insuficiencia renal crónica terminal tras una respuesta virológica sostenida con tratamiento antiviral de acción directa**

**Resumen**

**Introducción y objetivo:** Los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) e infección por el virus de la hepatitis C (VHC) pueden ser tratados de forma efectiva y segura con antivirales de acción directa (AAD). El objetivo de este estudio fue evaluar la mortalidad y la evolución de la función renal y hepática a largo plazo en una cohorte de pacientes con infección por VHC e IRC tratados con AAD.

**Métodos:** Se analizó la evolución de la función hepática y renal, así como la mortalidad en 135 pacientes con infección por VHC e IRC estadio 3b-5 que recibieron ombitasvir/paritaprevir/ritonavir±dasabuvir en un estudio multicéntrico.

**Resultados:** Ciento veinticinco pacientes se curaron (RVS), y 66 de ellos fueron incluidos. Antes de RVS, 53 estaban bajo terapia renal sustitutiva (TRS) y 25 (37,8%) tenían cirrosis hepática. Tras un seguimiento medio de 4,5 años, 25 (38%) requirieron trasplante renal, pero ninguno combinado renal-hepático. No se observaron cambios en la función renal entre aquellos 51 pacientes que no recibieron trasplante renal a pesar de que los valores de eGFR mejoraron en aquellos pacientes con IRC estadio 3b-4 de base. Tres (5,6%) pacientes pudieron dejar la TRS. Dieciocho (27,3%) pacientes fallecieron, principalmente por eventos cardiovasculares, 2 presentaron descompensación hepática y uno carcinoma hepatocelular. No se observó ninguna reinfección por VHC.

**Conclusiones:** La mortalidad a largo plazo fue alta. Globalmente no se objetivó una mejora en la función renal. A pesar de ello, en estadios 3b-4, la curación del VHC podría tener un papel positivo en la función renal.

© 2022 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection affects more than 70 million people worldwide.<sup>1</sup> Although liver-related disease and its complications are the main cause of morbidity and mortality, extrahepatic manifestations can occur in up to three-quarters of cases.<sup>2</sup> Furthermore, most data support that HCV-infected individuals are at a higher risk of renal disease than the general population. Although HCV-related nephropathy is uncommon, large evidence indicates that anti-HCV-positive individuals, especially those with viremic infection, are at a higher risk of developing chronic kidney disease (CKD) and progressing to end-stage renal disease.<sup>3-5</sup> In addition, increased liver-unrelated mortality, especially from cancer and cardiovascular events, has been described.<sup>6</sup>

Epidemiologically, the association between HCV and CKD is mainly due to exposure to the virus during dialysis or transfusion of blood derivatives. Furthermore, HCV infection can induce kidney disease by cytopathic and immune-mediated tissue damage.<sup>7</sup> Immunoglobulin deposits can cause cryoglobulinemic nephropathy and membranoproliferative or membranous glomerulonephritis, which have been described classically as the major causes of HCV infection-related nephropathy.<sup>8</sup> In addition to direct and indirect renal damage, genetic variables and cardiovascular comorbidities, the oxidative stress generated by chronic HCV infection leads to increased insulin resistance, a higher percentage of diabetes mellitus, and accelerated atherosclerosis contributing to increased cardiovascular risk.<sup>7</sup> As a result, HCV itself has been proposed as an independent cardiovascular risk factor.<sup>9,10</sup>

The outcome of chronic HCV infection has radically changed since the introduction of direct acting antiviral (DAA) agents. The favorable safety profile and high rates of sustained virological response (SVR) have led to the view that hepatitis C elimination is a realistic objective in several geographical areas. It has been widely documented that the risk of liver-related complications and overall mortality decreases after SVR.<sup>11</sup> Likewise, SVR achieves regression of fibrosis and even cirrhosis,<sup>12</sup> and reduces the risk of most extrahepatic manifestations.<sup>13,14</sup> In a large cohort of HCV patients with CKD treated with interferon-based regimens, the risk of end-stage kidney disease and death in those treated for at least 4 months was lower than that of untreated patients.<sup>15</sup>

DAA therapy is safe and highly effective in patients with CKD, end-stage renal disease, and those receiving renal replacement therapy (RRT).<sup>16</sup> Data from a prospective study including 441 patients with chronic HCV infection and CKD ( $> 30 \text{ mL/min/m}^2$ ) found that sofosbuvir-based regimens, old age, and advanced CKD were independently associated with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) decline during therapy.<sup>17</sup> In a retrospective case-control study including 523 HCV-CKD patients treated with DAAAs, a smaller eGFR decline was seen in the treated group than in the untreated control group at 1 year of treatment, but these differences disappeared with longer follow-up.<sup>18</sup> Overall, there is little data on long-term follow-up of patients with CKD treated with DAAAs for chronic HCV infection.

The aim of this study was to assess long-term mortality and morbidity in a cohort of HCV-infected individuals with stage 3b-5 CKD who

received ombitasvir/paritaprevir/ritonavir  $\pm$  dasabuvir (OBV/PTV/r  $\pm$  DSV) for 12-24 weeks, paying special attention to hepatic and renal function outcomes.

## Patients and methods

This is a multicenter, retrospective-prospective study including HCV-mono-infected or human immunodeficiency virus (HIV)-co-infected patients with HCV genotypes (GT) 1 or 4 and CKD stage 3b-5 who had previously participated in the Vie-KinD study. Patients had received OBV/PTV/r  $\pm$  DSV for 12-24 weeks between January and December, 2015.<sup>16</sup> Baseline and SVR12 data were retrieved from the Vie-KinD study database. Patients with a previous renal transplantation were included if they were not undergoing immunosuppressive therapy. Follow-up data were collected by a review of the patients' medical records until December 2020. The data collected were clinical parameters such as hypertension, diabetes, CKD stage, renal replacement requirement, kidney transplantation, presence of cirrhosis, episodes of liver decompensation (ascites, variceal bleeding, and encephalopathy), hepatocarcinoma, and cause of death as well as blood tests and HCV-RNA load. The prospective part of the study focused on patients who were alive and available to follow up. They were contacted for a medical visit, and blood testing (including blood count, AST, albumin, bilirubin, creatinine, eGFR, and HCV-RNA) and transient elastography.

A historical cohort of HCV-infected individuals undergoing RRT (Catalan Transplant Organization [OCATT], 2000-2015) before the availability of DAA therapy was used to compare mortality rates.

The eGFR was calculated based on the CKD-EPI equation. The CKD stage was defined according to the KDIGO guidelines<sup>19</sup>: grade 1  $\geq 90 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ , grade 2  $\geq 60-89 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ , grade 3a  $\geq 45-59 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ , grade 3b  $\geq 30-44 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ , grade 4  $\geq 15-29 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ , and grade 5  $< 15 \text{ mL/min}/1.73 \text{ m}^2$ . Liver fibrosis assessment was performed by liver stiffness measurement (LSM), and fibrosis stage was classified as follows: F4  $\geq 12.5 \text{ kPa}$ , F3  $\geq 9.5$ , F2  $\geq 7$ , and F0-F1  $< 7 \text{ kPa}$ . HCV-RNA was determined using an automated real-time PCR system (Cobas 6800, Roche). Causes of death were classified into six groups (cardiovascular, cancer, infectious disease, kidney-related disease, liver-related disease, and others). This study was approved by the Vall d'Hebron Hospital Ethics Committee and the Spanish and European Agency of Medicines and Medical Devices (code MMR-OMB-2020-01; date 03/04/2020) and was conducted in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice Guidelines, and local regulatory requirements. All participants gave written informed consent to participate in the study, and all data were anonymized.

## Statistical analysis

Normally-distributed quantitative variables were compared using the Student *t* test and expressed as median [IQR]. Variables with a non-normal distribution were analyzed with the Mann-Whitney *U* test and expressed as the median and

interquartile range or the range. Categorical variables were compared using the chi-square or Fisher exact test when frequencies were less than 5%, and expressed as frequencies and percentages. The 95% confidence interval of proportions was calculated using the Newcombe method.<sup>20</sup> The results were considered statistically significant when the *p*-value was lower than 0.05. All statistical analyses were carried out using IBM SPSS, 26 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

## Results

### Baseline characteristics

One hundred and thirty-five participants from 31 hospitals participated in the Vie-KinD study and 125 achieved SVR12. Sixty-six of those with a SVR were followed for more than 6 months and were included in the present study. The majority were men (69.7%), median age 58 [51–70] years, 98.5% Caucasians and 25 (37.9%) had liver cirrhosis, three of them with prior history of liver decompensation but compensated at the time of DAA therapy. The most common comorbidities were hypertension in 48 (72.7%), diabetes in 15 (22.7%), and dyslipidemia in 19 (28.8%). Three (4.5%) were HIV co-infected.

Concerning kidney disease, 3 (4.5%) had CKD stage 3b, 10 stage 4 (15.2%) and 53 (80.3%) stage 5. Fifty-three (80.3%) patients were receiving RRT, 49 (92.5%) were on hemodialysis and 4 on peritoneal dialysis. Thirty-one patients (47.0%) had history of previous kidney transplantation. The characteristics of the study patients at the time of DAAs initiation are summarized in Table 1. No changes in median creatinine and eGFR values were observed between baseline (prior to DAAs) and SVR12. Median creatinine and eGFR prior to DAA treatment were 5.6 [3.7–7.8] mg/dL and 10 [6.3–15.2] mL/min/1.73 m<sup>2</sup> and at SVR12 were 6.4 [4.3–8.3] mg/dL and 8 [6–16] mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, respectively.

### Renal function outcome after SVR

Twenty-five (37.9%) patients received a kidney transplant within a median period of 2.3 [0.9–2.8] years and all remained alive. None of them had HIV infection. Most of these patients (84.0%) had stage 5 CKD at the time of HCV therapy, and 19 (76.0%) were on dialysis. Despite the fact 7 (28.0%) of these patients presented liver cirrhosis, none required combined kidney–liver transplant. Overall, an improvement on serum creatinine (5.6 [3.7–7.8] mg/dL vs 2.9 [1.5–6.9] mg/dL, *p* = 0.002) and eGFR values (10 [6.3–15.2] mL/min/1.73 m<sup>2</sup> vs 20 [6.9–51.2] mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, *p* < 0.001) were observed after a median follow-up of 4.5 [3.7–5.1] years.

Among the 41 (62.1%) patients who did not undergo kidney transplantation, no changes in creatinine and eGFR values were observed during a median follow-up of 4 [2–5] years after DAA therapy (creatinine: 5.4 [3–7.8] mg/dL vs 6.6 [2.9–8] mg/dL, *p* = 0.512; eGFR: 10.6 [7–19.9] mL/min/1.73 m<sup>2</sup> vs 7.7 [6–21] mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, *p* = 0.992). However, CKD stage improved in 6 patients (14.6%) and worsened in 3 with prior CKD stage 4 (*p* < 0.001) (Table 2). At last-follow up 35 patients were on RRT: 30 out of

**Table 1** Baseline characteristics at the time of entry in the long-term follow up after SVR.

Baseline characteristics (n = 66)	
Sex (male)	46 (69.7%)
Age (years)	58 [51–70]
Race (Caucasian)	65 (98.5%)
Hypertension	48 (72.7%)
Diabetes	15 (22.7%)
Dyslipidemia	19 (28.8%)
HCV-HIV	3 (4.5%)
Platelets ( $\times 10^9$ L)	164 [133–210]
Albumin (mg/dL)	4.1 [3.7–5.0]
Bilirubin (mg/dL)	0.5 [0.4–0.6]
Cirrhosis	25 (37.9%)
Fibrosis	
F0–F1	19 (28.8%)
F2	9 (13.6%)
F3	13 (19.7%)
F4	25 (37.9%)
Kidney transplant	31 (47%)
CKD stage	
CKD 3b	10 (4.5%)
CKD 4	10 (15.2%)
CKD 5	53 (80.3%)
RRT	53 (80.3%)
Hemodialysis	49 (92.5%)

† Values are expressed as the number and percent and median [IQR] unless otherwise specified.

‡ CKD: chronic kidney disease; RRT: renal replacement therapy.

the 53 who were previously on RRT and 5 new patients who needed dialysis initiation. Renal function improvement led to discontinuation of RRT in 3 subjects, yielding a weaning rate from RRT of 5.6%. Finally, the 8 patients with baseline stage 3b–4 CKD had a slight increment in eGFR values over follow-up, although the differences did not reach statistical significance (Fig. 1).

### Liver disease outcome

During follow-up, 2 (5.3%) patients with baseline compensated cirrhosis developed liver decompensation (ascites and hepatic encephalopathy, respectively). In addition, 1 (2.6%) patient with liver cirrhosis developed hepatocellular carcinoma (HCC) within the first year after achieving SVR. None of them had HIV infection. None of the patients required liver transplantation. The only patient who died from liver disease was cirrhotic at baseline and died due to liver failure. In 51 subjects HCV-RNA was performed during follow-up (39 during the last visit and 12 additional patients within the prospective check-up) and no cases of reinfection were observed.

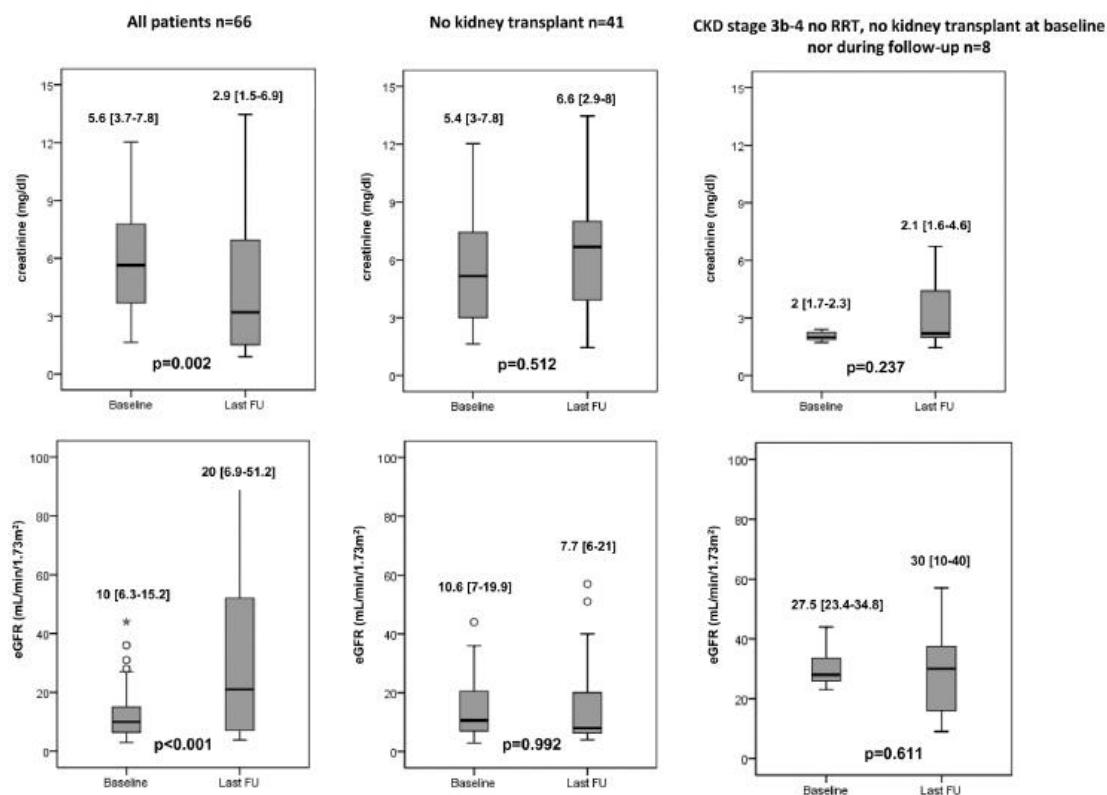
**Table 2** Distribution of Chronic kidney disease (CKD) stage at baseline and last follow-up in the 41 patients who did not undergo kidney transplantation.

	Baseline CKD stage			Total
	CKD stage 3b	CKD stage 4	CKD stage 5	
<i>CKD at last follow-up</i>				
CKD stage 3a	1 (2.4%)	0	1 (2.4%)	2 (4.9%)
CKD stage 3b	2 (4.9%)	1 (2.4%)	0	3 (7.3%)
CKD stage 4	0	2 (4.9%)	3 (7.3%)	5 (12.2%)
CKD stage 5	0	3 (7.3%)	28 (68.3%)	31 (75.6%)
<i>Total</i>	3 (7.3%)	6 (14.6%)	32 (78.1%)	41 (100%)

CKD stages at baseline and last follow-up of the 41 patients who did not undergo kidney transplantation; 1 (2.4%) patient was CKD stage 3b at baseline and stage 3a at LFU, 1 (2.4%) was CKD stage 4 at baseline and 3b at LFU, 1 (2.4%) was CKD stage 5 at baseline and 3a at LFU, and 3 (7.3%) were CKD stage 5 at baseline and stage 4 at LFU. The CKD stage worsened in 3 (7.3%) patients who were stage 4 at baseline and progressed to stage 5 at LFU.

† Values are expressed as the number and percent.

‡ CKD: chronic kidney disease; LFU: last follow-up.

**Figure 1** Median creatinine and eGFR at baseline and last-follow up visit.

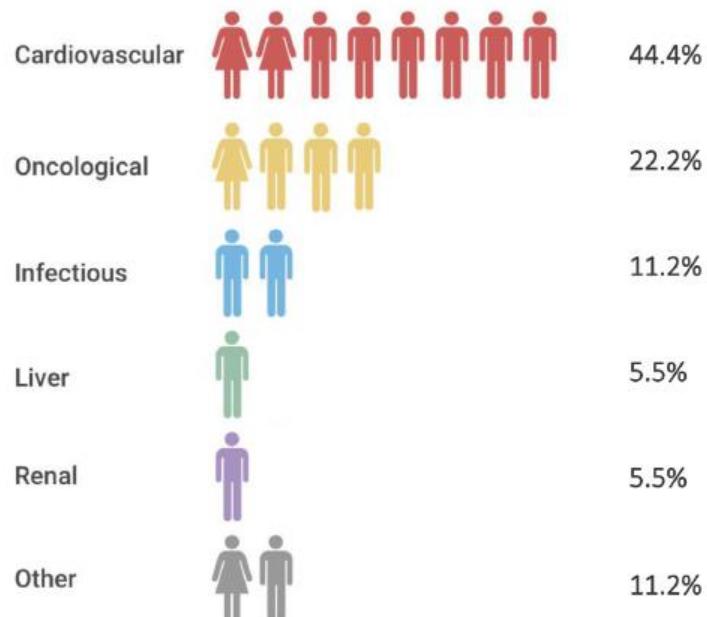
† Values are expressed as median [IQR].

‡ eGFR (estimated).

#### Overall mortality and comparison of mortality rates with a historical cohort of CKD patients

Eighteen (27.3%) patients, most of them receiving RRT (16, 88.9%), died during a median follow-up of 4.5 [3.7-5] years.

None of them had HIV infection. Main causes of mortality are shown in Fig. 2. The mortality rate among the 53 patients receiving RRT at baseline was 26.4% and 30.8% in those without RRT ( $p=0.5$ ). Mortality among the 30 patients who remained on RRT during the total follow-up was 40.0%.



**Figure 2** Causes of mortality.

† Values are expressed as the number (represented by individual figures) and percentage.

All-cause mortality in cirrhotic patients (44.0%) was higher than in non-cirrhotic ones (17.1%) ( $p=0.02$ ).

Over a median follow-up of 4.3 years [2.7–4.9] the survival rate of our cohort of 53 HCV patients undergoing RRT was compared with the one from an historical cohort from the Catalan Transplant Organization (OCATT) including 16,834 patients who began RRT between 2000 and 2019. This cohort included 772 anti-HCV positive patients who initiated RRT between 2000 and 2015. No data on the percentage of HCV viremic patients could be retrieved. No differences in survival rate were observed among those anti-HCV negative who initiated RRT between 2000 and 2010 and those who began between 2011 and 2019, though it was greater than observed among anti-HCV positive subjects ( $p<0.001$ ), as shown in Fig. 3. For comparison with our cohort, only the 53 patients who were on RRT before DAA therapy were included. The four-year survival (median follow-up duration) in this group of patients was 75.1%, significantly higher than that reported in the HCV-positive cohort from the OCATT (75.1% vs 43.6%.  $p<0.001$ ).

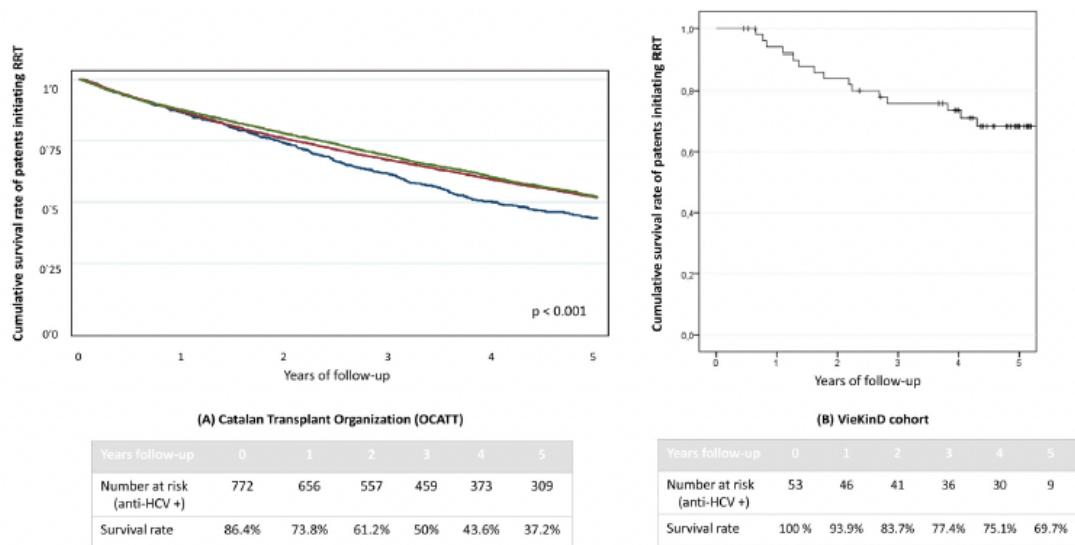
#### Prospective follow-up

Twenty-four (36.4%) patients (14 men and 10 women) came to an additional medical appointment and blood test were performed. Median follow-up of this cohort was 5.3 [4.9–5.4] years. Fourteen patients received kidney transplantation. Among the 10 patients who did not undergo transplantation, 8 had CKD stage 5 before DAA and showed no renal function improvement during follow-up. In the remaining 2 patients, both CKD stage 3b at baseline, CKD stage improved to stage 1 and 2, respectively ( $p=0.2$ ). LSM

was performed in 19 subjects, showing a significant improvement in liver fibrosis (follow-up 6.2 [5–10.1] kPa vs 9.7 [6.1–14.4] kPa at baseline,  $p=0.027$ ). From the 12 subjects with baseline LSM of advanced fibrosis, just six (50%) continued with LSM >12.5 kPa at the prospective appointment. None of these 24 patients presented HCV reinfection.

#### Discussion

To our knowledge this study has the longest follow-up of HCV-infected individuals with advanced CKD treated with DAA. CKD is a complex condition, and numerous factors are involved in its progression and outcomes. Hence, estimating the impact of HCV clearance in this scenario is a challenging task, especially in advanced stages of kidney disease. Our results showed trends to an eGFR improvement in patients with stage 3b-4 CKD at baseline, but not in those with end-stage CKD, the vast majority of patients included in the cohort. Although the overall results showed an improvement of renal function (creatinine and eGFR) at last follow-up, this is mostly due to the increase in eGFR and decrease in creatinine values experienced amongst those patients who received a kidney transplant. A more realistic assessment of our results is that renal function did not improve in the 41 patients who did not receive a kidney transplant, although 3 (9.1%) patients were able to discontinue RRT and 6 (14.6%) showed an improvement in the CKD stage. In comparison to our observations, the results from a cohort of 523 CKD-HCV patients followed for 1 year after DAA treatment showed a smaller eGFR decline in those who achieved SVR12, although this decline was not different when compared to an untreated historical HCV-CKD



**Figure 3** Comparison of survival rate with a historical cohort of patients with CKD. (A) OCATT five-year survival rate of three cohorts of patients undergoing renal replacement therapy. Blue line refers to anti-HCV positive patients who initiated renal replacement therapy (RRT) between the year 2000 and 2015. Red line corresponds to anti-HCV negative patients who initiated RRT between the years 2011 and 2019. As we can see, anti-HCV positive (blue) patients have a significantly lower survival rate than both anti-HCV negative cohorts (red and green lines). (B) VieKinD five-year survival rate of the 53 patients who were under renal replacement therapy prior to initiation of DAA therapy.

† CKD: chronic kidney disease; OCATT: Organització Catalana de Transplantaments; RRT: renal replacement therapy; DAA: direct-acting antiviral.

cohort.<sup>18</sup> Likewise, an improvement in eGFR from baseline to 12 weeks post-therapy was described in 403 HCV-infected individuals, with or without CKD. In that study, a greater eGFR improvement was found among patients with baseline eGFR below 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>.<sup>21</sup> Similarly, regression models from short-term follow-up of DAA-treated CKD-HCV-infected individuals showed that HCV cure was associated with a 9.3 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> improvement in eGFR during the 6 months after treatment.<sup>22</sup> However, these studies are heterogeneous and not entirely comparable to the present study because they did not include patients with end-stage CKD, which could easily explain the overall differences relative to our observations. Older age and male sex have been linked to kidney disease progression; median age at baseline in our cohort was approximately 60 years and almost two-thirds were men. We found no significant improvement in cardiovascular comorbidities after HCV elimination, and unfortunately, we were unable to evaluate the prevalence of cryoglobulinemia, at baseline or during follow-up, nor the changes in proteinuria as a marker of CKD progression because consistent data were not retrieved. Thus, based on our results, we believe that HCV clearance has a positive impact on renal function, but this effect seems to be minimal or nonexistent in patients with end-stage CKD due to the advanced renal damage.

Liver decompensation and HCC development were uncommon after DAA treatment in our patients, even though approximately 60% of them had advanced fibrosis or

cirrhosis, in most cases compensated at baseline. It is relevant to mention that none of the transplanted patients required a combined transplant (kidney–liver). It has been amply demonstrated that achieving SVR reduces the risk of liver-related mortality and disease progression. In a recent study including 869 HCV patients treated with DAA, the risk of clinical disease progression after a long-term follow-up was reduced in Child–Pugh A patients, but not in Child–Pugh B/C.<sup>23</sup> Similarly, results from long-term follow-up of 1760 HCV patients showed a significant decrease in all-cause mortality and liver-related complications. Although some patients had such complications, the annual incidence rate (4.1%) was lower than the expected rate documented during the natural history of HCV.<sup>11</sup> In our cohort, liver-related complications occurred in 5.3% of patients and HCC in almost 3%. All these patients had advanced liver fibrosis prior to DAA and one had experienced liver decompensation prior to DAA therapy. Regarding the HCC diagnosis, it is important to note that it was diagnosed during the first year after DAA treatment (10 months after). Data from a prospective follow-up of a large cohort of HCV patients treated with DAA or IFN showed that HCC development after DAA treatment had a 3-year crude incidence of 5.9%, which reached its maximum and stabilized at 1 year after the end of treatment.<sup>24</sup> Although HCV cure stops progression of liver disease, fibrosis regression can take years.<sup>25</sup> Thus, the risk of decompensation or HCC, although decreased, remains high in advanced fibrosis stages, especially in patients with decompensated

cirrhosis at baseline, and this could be the reason for the liver-related events observed. In addition, and related to fibrosis regression, a significant improvement in LSM measurement was seen in the prospective evaluation. Although there is evidence supporting the lack of correlation between post-SVR LSM and fibrosis stage, a recent study has described a risk reduction of liver related complications and death in those patients whose LSM measurement decreased more than 20% after SVR.<sup>26</sup>

Furthermore, our cohort included a high percentage of patients with diabetes, hypertension or dyslipidemia, making it difficult to rule out nonalcoholic fatty liver disease as a coexistent etiology for the liver disease progression. In that sense, data from a retrospective study including more than 33,000 HCV patients treated with DAAs reported an increased risk of mortality and liver decompensation among patients with diabetes.<sup>27</sup> Finally, no cases of documented HCV reinfection were detected among the 51 patients who had a currently available HCV-RNA determination during follow-up reflecting the improvement in universal precautions and in dialysis and blood transfusions.

Mortality was high in our cohort (27.3%), especially among patients undergoing RRT. It is well recognized that patients on RRT are at a higher risk of death than the general population, especially those receiving hemodialysis.<sup>28</sup> Cardiovascular disease is the main cause of death in this population. Although several studies have shown an increased overall risk of cancer in patients with end-stage CKD, there is still some controversy in this line.<sup>29</sup> A retrospective study including more than one million adults concluded that eGFR decreases are independently associated with a higher risk of renal and urothelial cancer, but not with other cancer types.<sup>30</sup> In our cohort, cardiovascular events and cancer (2 lung, 1 colorectal and 1 breast cancer) were responsible for more than 50% of deaths and mortality was significantly higher in cirrhotic patients. Finally, survival rate of our patients receiving renal replacement therapy was significantly higher than those observed in OCATT's cohort despite the fact the sample sizes are not comparable and the lack of some sensitive information such as the number of viremic patients. Nevertheless, in Spain, DAA therapy was not universally available before 2015 and many HCV patients were not treated, including those with end stage renal disease. Thus, we assumed that a significant number of anti-HCV-positive patients from OCATT's cohort would be viremic at that point, which could reasonably explain the survival rate differences observed in our study.

The main limitations of our study are the predominant retrospective nature of the data and the relatively small proportion of patients from the VieKinD cohort who were followed and were able to be included. In this sense, information of some of the remaining patients included in the ViekinD cohort could not be retrieved by some health-care units due to the impact of the COVID-19 pandemic. Moreover, the high percentage of patients with end-stage CKD or undergoing RRT may have prevented us from observing a significant improvement in renal function after the long-term follow-up. As a counterpart to these limitations, this is a multicenter study including patients from 31 hospitals in Spain with a lengthy follow-up after DAA treatment.

In summary, mortality is high in end-stage CKD HCV patients treated with DAAs, mainly due to cardiovascular

events and cancer. Overall, renal function did not improve after HCV treatment, but a slight, non-significant improvement in the eGFR was seen in patients in stage 3b-4 at baseline. Liver decompensation and hepatocarcinoma were infrequent, even though a large percentage of patients had advanced fibrosis.

## Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Ethical approval

The study was designed, implemented and reported in accordance with the Declaration of Helsinki Good Clinical Practice guidelines, and local regulatory requirements. The study was approved by the ethics committee of all participating centers and by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (MMR-OMB-2020-01).

## Conflict of interest

**Joan Martínez-Campreciós:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Mar Riveiro-Barciela:** MRB has received research educational and/or travel grants from Gilead and has served as a speaker for Gilead and Grifols.

**Raquel Muñoz-Gómez:** The author declares that there is no conflict of interest.

**María-Carlota Londoño:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Mercé Roget:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Miguel Ángel Serra:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Desamparados Escudero-García:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Laura Purchades:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Manuel Rodríguez:** MR has served as an advisor/lecturer for Gilead and Abbvie.

**Juan E. Losa-García:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Maria L. Gutiérrez:** MLG reports collaboration with Gilead and Abbvie.

**Isabel Carmona:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Javier García-Samaniego:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Luis Morano:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Ignacio Martín-Granizo:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Marta Montero-Alonso:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Martín Prieto:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Manuel Delgado:** MD reports ABBVIE funding for scientific advice and continuing medical education

**Natalia Ramos:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Maria A. Azancot:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Francisco Rodriguez-Frías:** The author declares that there is no conflict of interest.

**Maria Buti:** MB has served as speaker and advisor for Gilead and Abbvie.

## References

1. Cooke GS, Andrieux-Meyer I, Applegate TL, Atun R, Burry JR, Cheinquer H, et al. Accelerating the elimination of viral hepatitis: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2019;4:135–84.
2. van der Meer AJ, Berenguer M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. J Hepatol. 2016;65:595–108.
3. Molnar MZ, Alhourani HM, Wall BM, Lu JL, Streja E, Kalantar-Zadeh K, et al. Association of hepatitis C viral infection with incidence and progression of chronic kidney disease in a large cohort of US veterans. Hepatology (Baltimore, MD). 2015;61:1495–502.
4. Li M, Wang P, Yang C, Jiang W, Wei X, Mu X, et al. A systematic review and meta-analysis: does hepatitis C virus infection predispose to the development of chronic kidney disease? Oncotarget. 2017;8:10692–702.
5. Park H, Adeyemi A, Henry L, Stepanova M, Younossi Z. A meta-analytic assessment of the risk of chronic kidney disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat. 2015;22:897–905.
6. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, You SL, Wang LY, et al. Chronic hepatitis C virus infection increases mortality from hepatic and extrahepatic diseases: a community-based long-term prospective study. J Infect Dis. 2012;206:469–77.
7. Pol S, Parlati L, Jadoul M. Hepatitis C virus and the kidney. Nat Rev Nephrol. 2019;15:73–86.
8. Ozkok A, Yildiz A. Hepatitis C virus associated glomerulopathies. World J Gastroenterol. 2014;20:7544–54.
9. Petta S, Macaluso FS, Craxi A. Cardiovascular diseases and HCV infection: a simple association or more? Gut. 2014;63:369–75.
10. Domont F, Cacoub P. Chronic hepatitis C virus infection, a new cardiovascular risk factor? Liver Int. 2016;36:621–7.
11. Mendizabal M, Piñero F, Ridruejo E, Herz Wolff F, Anders M, Reggiardo V, et al. Disease progression in patients with hepatitis C virus infection treated with direct-acting antiviral agents. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020;18, 2554–2563.e3.
12. Verna EC, Morelli G, Terrault NA, Lok AS, Lim JK, Di Bisceglie AM, et al. DAA therapy and long-term hepatic function in advanced/decompensated cirrhosis: real-world experience from HCV-TARGET cohort. J Hepatol. 2020;73:540–8.
13. Mahale P, Engels EA, Li R, Torres HA, Hwang LY, Brown EL, et al. The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. Gut. 2018;67:553–61.
14. Hsu YC, Lin JT, Ho HJ, Kao YH, Huang YT, Hsiao NW, et al. Antiviral treatment for hepatitis C virus infection is associated with improved renal and cardiovascular outcomes in diabetic patients. Hepatology (Baltimore, MD). 2014;59:1293–302.
15. Chen YC, Li CY, Tsai SJ, Chen YC. Anti-hepatitis C virus therapy in chronic kidney disease patients improves long-term renal and patient survivals. World J Clin Cases. 2019;7:1270–81.
16. Londoño MC, Riveiro-Barciela M, Ahumada A, Muñoz-Gómez R, Roget M, Devesa-Medina MJ, et al. Effectiveness, safety/tolerability of OBV/PTV/r±DSV in patients with HCV genotype 1 or 4 with/without HIV-1 co-infection, chronic kidney disease (CKD) stage IIIb-V and dialysis in Spanish clinical practice – Vie-KinD study. PLOS ONE. 2019;14:e0221567.
17. Liu CH, Lee MH, Lin JW, Liu CJ, Su TH, Tseng TC, et al. Evolution of eGFR in chronic HCV patients receiving sofosbuvir-based or sofosbuvir-free direct-acting antivirals. J Hepatol. 2020;72:839–46.
18. Aby ES, Dong TS, Kawamoto J, Pisegna JR, Benhammou JN. Impact of sustained virologic response on chronic kidney disease progression in hepatitis C. World J Hepatol. 2017;9:1352–60.
19. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. Ann Intern Med. 2013;158:825–30.
20. Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Stat Med. 1998;17:857–72.
21. Coppola N, Portunato F, Buonomo AR, Staiano L, Scotti R, Pinchera B, et al. Interferon-free regimens improve kidney function in patients with chronic hepatitis C infection. J Nephrol. 2019;32:763–73.
22. Sise ME, Backman E, Ortiz GA, Hundemer GL, Ufere NN, Chute DF, et al. Effect of sofosbuvir-based hepatitis C virus therapy on kidney function in patients with CKD. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12:1615–23.
23. Krassenburg LAP, Maan R, Ramji A, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H, et al. Clinical outcomes following DAA therapy in patients with HCV-related cirrhosis depend on disease severity. J Hepatol. 2021;74:1053–63.
24. Nahon P, Layese R, Bourcier V, Cagnot C, Marcellin P, Guyader D, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma after direct antiviral therapy for HCV in patients with cirrhosis included in surveillance programs. Gastroenterology. 2018;155, 1436–1450.e6.
25. D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V, et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. Hepatology (Baltimore, MD). 2012;56:532–43.
26. Piedade J, Pereira G, Guimarães L, Duarte J, Victor L, Baldin C, et al. Liver stiffness regression after sustained virological response by direct-acting antivirals reduces the risk of outcomes. Sci Rep. 2021;11:11681.
27. Benhammou JN, Moon AM, Pisegna JR, Su F, Vutien P, Moylan CA, et al. Nonalcoholic fatty liver disease risk factors affect liver-related outcomes after direct-acting antiviral treatment for hepatitis C. Dig Dis Sci. 2021;66:2394–406.
28. Neovius M, Jacobson SH, Eriksson JK, Elinder CG, Hylander B. Mortality in chronic kidney disease and renal replacement therapy: a population-based cohort study. BMJ Open. 2014;4:e004251.
29. Goodkin DA, Bragg-Gresham JL, Koenig KG, Wolfe RA, Akiba T, Andreucci VE, et al. Association of comorbid conditions and mortality in hemodialysis patients in Europe, Japan, and the United States: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). J Am Soc Nephrol. 2003;14:3270–7.
30. Lowrance WT, Ordoñez J, Udaltsova N, Russo P, Go AS. CKD and the risk of incident cancer. J Am Soc Nephrol. 2014;25:2327–34.

## 10.2 Publicación 2

Martínez-Campreciós J, Rando-Segura A, Buti M, et al. Reflex viral load testing in dried blood spots generated by plasma separation card allows the screening and diagnosis of chronic viral hepatitis. *J Virol Methods*. 2021;289:114039. doi:10.1016/j.jviromet.2020.114039

*Journal of Virological Methods* 289 (2021) 114039



### Reflex viral load testing in dried blood spots generated by plasma separation card allows the screening and diagnosis of chronic viral hepatitis

Joan Martínez-Campreciós <sup>a,b,e</sup>, Ariadna Rando-Segura <sup>b,c,e</sup>, María Buti <sup>a,b,d,\*</sup>, Fernando Rodrigo-Velásquez <sup>b,c,e</sup>, Mar Riveiro-Barciela <sup>a,b,d</sup>, Ana Barreira-Díaz <sup>a,b</sup>, Patricia Álvarez-López <sup>a,b</sup>, Paula Salmerón <sup>b,c,e</sup>, Adriana Palom <sup>a,b</sup>, David Tabernero <sup>d,k</sup>, Nieves Palomo <sup>a,b</sup>, Arlete Nindia <sup>f</sup>, Gisela Barbosa <sup>f</sup>, Eva López <sup>f</sup>, Vicelma Ferreira <sup>g</sup>, Nelsa Saiago <sup>g</sup>, Alison Kuchta <sup>h</sup>, Roser Ferrer-Costa <sup>i</sup>, Rafael Esteban <sup>a,b,d</sup>, Israel Molina <sup>j</sup>, Francisco Rodríguez-Frías <sup>d,i,k</sup>

<sup>a</sup> Liver Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 080335 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> CIBERehd, Instituto Carlos II, Spain

<sup>e</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain

<sup>f</sup> Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola

<sup>g</sup> Hospital General de Benguela, Universidad Katayava Bwila, Benguela, Angola

<sup>h</sup> Roche Molecular Systems, Inc, Pleasanton, CA, USA

<sup>i</sup> Biochemistry Department, Clinical Laboratories Hospital Universitari Vall d'Hebron, Spain

<sup>j</sup> Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>k</sup> Liver Pathology Unit, Biochemistry and Microbiology Departments, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Dried blood spots

Hepatitis B

Hepatitis C

Hepatitis D

#### ABSTRACT

Dried blood spots (DBS) have been proposed as an alternative diagnostic technique for chronic viral hepatitis. The aim of this observational study was to correlate serologic HBV, HCV, and HDV status and reflex the respective viral load testing by PSC-DBS samples from capillary blood vs conventional plasma samples in patients with chronic viral hepatitis. Besides, we apply these tests in a prospective study for chronic viral hepatitis diagnosis in a rural region of sub-Saharan Africa. In total, 124 HBsAg-positive patients, 75 anti-HCV positive, 2 with HBV–HCV coinfection, and 13 anti-HDV positive were included. PSC-DBS sensitivity/specificity was 98.4% /96.2 % for HBsAg detection, 98.7 %/100 % for anti-HCV, and 84.6 %/100 % for anti-HDV. HCV-RNA was quantified in all viremic patients using DBS. Only 42 of 78 (53.8 %) samples with HBV-DNA viremia were quantifiable by DBS. Sensitivity increased to 95.7 % in patients with HBV-DNA levels >2000 IU/mL. There was a high correlation between DBS and venous blood. The prevalence of HBsAg among the 93 individuals tested in Angola was 11 %, and 60 % of cases had detectable HBV-DNA viremia. As a conclusion, PSC-DBS is useful for chronic viral hepatitis screening and reflex molecular diagnosis showing globally high sensitivities and correlation with conventional blood samples.

#### 1. Introduction

An estimated 250 million people are chronically infected by hepatitis B virus (HBV) and 70 million by hepatitis C virus (HCV) worldwide. A huge burden of these infections lies in low- and middle-income countries where access to diagnosis and treatment is limited (World Health Organization, 2016).

Organization, 2016). Less than 5% of all individuals with chronic viral hepatitis are aware of the infection. Due to the increasing incidence of these diseases and the related mortality, the World Health Organization (WHO) released the first global strategy for elimination of viral hepatitis in 2016 (World Health Organization, 2016). Since then, considerable progress has been made in HBV vaccination coverage and blood

\* Corresponding author at: Passeig de la Vall d'Hebron 119, 08035, Barcelona, Spain.  
E-mail address: [mbuti@hebron.net](mailto:mbuti@hebron.net) (M. Buti).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114039>

Received 21 September 2020; Received in revised form 3 December 2020; Accepted 6 December 2020

Available online 15 December 2020  
0166-0934/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

This article was published in the *Journal of Virological Methods*, Vol 289, Joan Martínez-Campreciós et al, Reflex viral load testing in dried blood spots generated by plasma separation card allows the screening and diagnosis of chronic viral hepatitis, Copyright Elsevier (March 2021)

donation safety, but there is still a need to improve the diagnosis. In that line, the WHO is promoting the development of simple, rapid diagnostic tests (RDTs) that can be used as point-of-care tests and reach remote areas and groups outside the health system (World Health Organization, 2016).

Point-of-care tests and RDTs providing an immediate diagnosis have become an alternative option for diagnosing multiple diseases, from diabetes to malaria. They are easy to perform and read, and matrices such as capillary blood and oral fluid samples can be used. In the setting of infectious disease, antigens, antibodies, and nucleic acids can be detected. Several RDTs for HBV and HCV detection are currently available. They show acceptable sensitivity and specificity, but only provide a serologic result and therefore, an incomplete diagnosis (Chevaliez and Pawlotsky, 2018; Cooke et al., 2019).

The first step in diagnosing HBV and HCV infection is a test performed with venous blood for serologic determination of HBsAg and anti-HCV antibodies, respectively. This is followed by nucleic acid tests (NATs)—HBV DNA in persons testing HBsAg positive, and HCV RNA in those anti-HCV positive—to identify patients with detectable viremia who could be eligible for antiviral treatment. Point-of-care NATs developed to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex and diagnose multidrug resistance have profoundly changed the medical approach for tuberculosis in many endemic areas (Yoon et al., 2012). Likewise, HCV and HBV virologic diagnosis is also feasible by point-of-care NATs, with approximately 100% sensitivity and specificity for both viruses (Grebely et al., 2017; Abravanel et al., 2020). Despite their excellent accuracy, implementation of these tests in low-income countries may be difficult in the immediate future due to their high cost and the need for specialized laboratories.

Dried blood spot (DBS) testing has proved to be a feasible alternative diagnostic tool for infectious diseases such as human immunodeficiency virus (HIV) (Andreotti et al., 2010; Carmona et al., 2019). It is affordable and easy to perform, as blood can be collected and stored on blotter paper by untrained personnel (Chevaliez and Pawlotsky, 2018). Later, the blood can be analyzed by regaining plasma from the blotter paper and processing by usual laboratory techniques. A meta-analysis including 19 studies compared DBS to venous blood sampling and reported a pooled sensitivity and specificity of 98% and 100%, respectively, for HBsAg and 98% and 99% for anti-HCV, confirming excellent diagnostic accuracy (Lange et al., 2017). HBV and HCV viral load, analyzed in DBS samples showed lower sensitivity for HBV-DNA detection than for HCV-RNA, but overall, both tests showed a strong correlation with the results in plasma samples (Soulier et al., 2016; Jardi et al., 2004; Mohamed et al., 2013). Detection of anti-HDV antibodies and HDV-RNA for the diagnosis of hepatitis D has also been done using DBS, with good performance (Jackson et al., 2019). The main limitation of DBS is the lower sensitivity for detecting small viral loads and serologic markers, and the variability associated with the paper used. Plasma separation cards (PSCs) incorporate improvements in the sample such as a filter to separate blood cells from plasma, an RNA stabilizer and a larger volume capacity (140  $\mu$ L) in each of the three spots than other protein-saver cards (Carmona et al., 2019). Initial studies using PSCs for DBS testing have reported good results in the diagnosis of HIV and HCV infection (Carmona et al., 2019; Marins et al., 2020).

The aim of this study was to evaluate the serologic and virologic performance of plasma separation card dried blood spot (PSC-DBS) testing in patients previously diagnosed with HBV, HCV, or HDV infection, comparing the results with those obtained using conventional venous blood samples. In addition, we evaluated the usefulness of these cards in a prospective pilot study, in which screening for chronic viral hepatitis was carried out in a high endemic area of sub-Saharan Africa.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

Prospective, observational validation study performed in Hospital Vall d'Hebron, Barcelona (Spain), followed by a pilot survey in Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal (Angola).

For the prospective, observational study, we selected non-consecutive patients undergoing follow-up at the outpatient clinic of the Hospital Vall d'Hebron Liver Unit from October to December 2019. We included anti-HCV-positive patients regardless of the presence of HCV RNA, HBsAg-positive patients, and a small number of patients with anti-HDV antibodies. Two blood samples were collected simultaneously from each patient, a conventional venous blood sample and a capillary sample for PSC-DBS testing. Venous blood was collected in EDTA tubes, and serum was placed in plasma gel separation tubes to perform the routine analysis. A complete PSC (Cobas® Plasma Separation Card, Pleaseanton, CA) containing 3 DBS was spotted with whole capillary blood to validate the performance of this sample. The card was left to dry for at least 4 days. Then, each of the three blood spots was removed from the PSC using dressing forceps and processed following the established protocol. (Text 2.2–2.3 and Fig. 1).

In addition, during the month of December 2019, we conducted a survey at the Nossa Senhora da Paz Hospital. Non-consecutive volunteers older than 18 years were selected from the hospital's outpatient clinic. Demographics, clinical, and epidemiological data were recorded. Blood count, serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) analyses were performed at the Cubal Hospital laboratory. Capillary blood was collected to fill a complete PSC (3 DBS), allowed to dry, and then shipped by ordinary mail to the Hospital Vall d'Hebron clinical laboratory. All samples were processed within three weeks after collection.

### 2.2. Serologic markers

An automated electrochemiluminescent system (Cobas 8000, Roche) was used to measure HBsAg (Elecsys HBsAg II), anti-HBc antibodies (Elecsys Anti-HBc II), and anti-HCV (Elecsys Anti HCV II) in conventional samples and PSC-DBS. In HBsAg-positive cases, anti-HDV antibodies were determined using the LIAISON XL murex anti-HDV assay on an automated chemiluminescent system (Liaison, DiaSorin) in serum samples and the respective DBS eluates. All serologic markers were performed with the eluate of 1 of the 3 DBS. For plasma elution, one DBS was removed from the PSC and incubated at 37 °C with 600  $\mu$ L of diluent (Elecsys universal diluent) overnight (at least 8 h) (Fig. 1). If HBsAg, anti-HCV, or anti-HDV tested positive, a reflex nucleic acid amplification test was performed.

### 2.3. Virologic markers

An automated real-time PCR system (Cobas 6800, Roche) was used to measure HBV-DNA (Cobas HBV test) and HCV-RNA (Cobas HCV test) in plasma samples and the respective DBS eluates. Additionally, an in-house nucleic acid amplification test was used to measure HDV-RNA (Homs et al., 2014). Each of these assays was performed with the eluate of 1 DBS. In case of an HBV, HCV and HDV coinfection an extra DBS should be collected to perform all NAAT testing. To extract nucleic acids from the PSC, individual DBS were removed from the cards and incubated at 56 °C with 950  $\mu$ L of specimen pre-extraction reagent (Roche®) for 10 min at 1000 rpm on a preheated thermoshaker (Fig. 1). All samples were loaded on the Cobas 6800 system for nucleic acid extraction, amplification, and detection in accordance with the instructions for plasma using the 500  $\mu$ L processing volume option.

This study was approved by the Vall d'Hebron Ethics Committee (PR (AG)399–2019-03/10/2019) and was conducted in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice

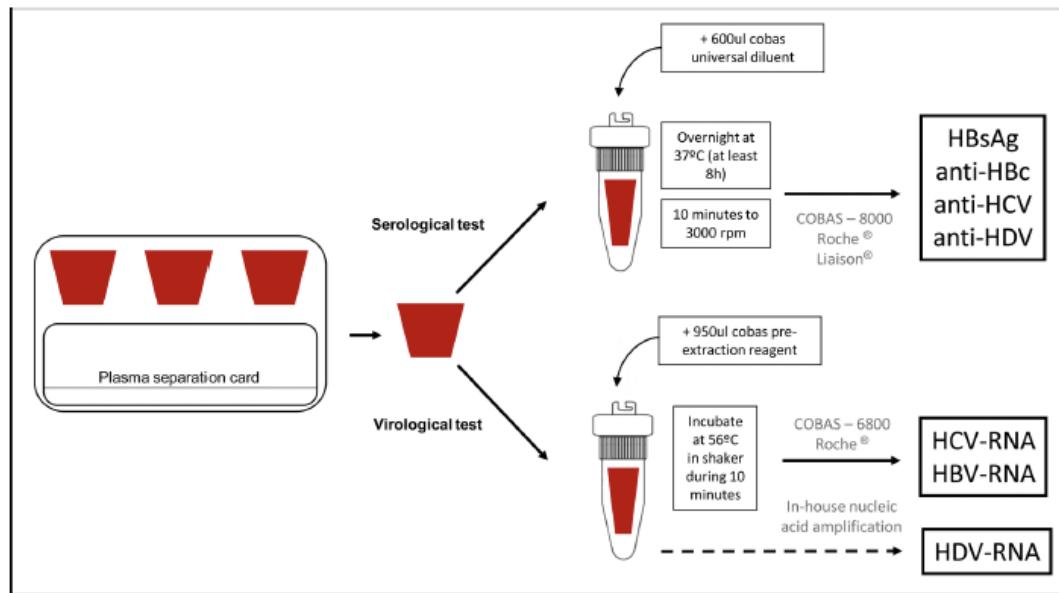


Fig. 1. PSC extraction and processing.

After leaving the card to dry for at least 4 days, 1 dried blood spot was separated from the PSC, diluted with 600  $\mu$ L of solution, and left overnight at 37°C for serologic testing. The sample was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm and placed in a Cobas 8000/Liaison system for analysis. For viral load analysis, 1 dried blood spot was used for each viral load. The spot was diluted with 950  $\mu$ L of solution, incubated in a shaker at 56°C for 10 min, and processed in a Cobas 6800 system.

HBsAg: hepatitis B surface antigen; anti-HBc: antibodies against hepatitis B core antigen; anti-HCV: antibodies against hepatitis C virus; anti-HDV: antibodies against hepatitis D virus; HCV-RNA: hepatitis C virus ribonucleic acid; HBV-DNA: hepatitis B virus deoxyribonucleic acid; HDV-RNA: hepatitis D virus ribonucleic acid.

Guidelines, and local regulatory requirements.

#### 2.4. Statistical analysis

Normally-distributed quantitative variables were compared using the Student *t* test and expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Variables with a non-normal distribution were analyzed with the Mann-Whitney *U* test and expressed as the median and interquartile range or the range. Categorical variables were compared using the chi-square or Fisher exact test when frequencies were less than 5% and expressed as frequencies and percentages. The Pearson correlation was performed to compare viral load in venous blood and PSC-DBS. The 95% confidence interval of proportions was calculated using the Newcombe method (Newcombe, 1998). All statistical analyses were carried out using IBM SPSS, 26 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Observational prospective validation study in a tertiary hospital

##### 3.1.1. Hepatitis B, C, and D serologies

In total, 201 samples from chronic viral hepatitis patients were included: 124 patients were HBsAg positive, 75 had anti-HCV antibodies, and 2 patients tested positive to both. Among the 124 HBsAg-positive patients, 16 (12.7%) were HBeAg positive, and 13 (6.5%) had anti-HDV antibodies. Of 126 patients testing HBsAg positive by venous blood analysis, 124 were detected by capillary blood DBS analysis. There were 2 (1.6%) false-negative results by DBS (both weakly HBsAg positive in venous blood: qHBsAg 0.1 and 0.08 IU/ml, respectively) and 3 (2.4%) false-positives (anti-HBc negative). DBS detected 76 of 77 anti-HCV patients with only 1 false-negative result that corresponded to a non-viremic anti-HCV patient on venous blood analysis. Therefore, the sensitivity of PSC-DBS analysis was 98.4% and 98.7% for

HBV and HCV, respectively, and the specificity was 96% and 100%. The positive and negative predictive values of DBS tests compared to conventional tests with 95% confidence intervals are summarized in Table 1.

Overall, 145/201 (72.1%) patients tested positive for anti-HBc in venous blood samples, including all 124 HBsAg-positive patients, the 2 HBV/HCV coinfections, and 21 additional patients in the anti-HCV-positive group. By comparison, anti-HBc was detected using PSC-DBS in 139 of the 145 patients and there were 6 (4.1%) false-negative results. Of note, 2 of these 6 patients were HBsAg positive with undetectable HBV DNA on routine analysis.

DBS detected 11 of the 13 patients testing anti-HDV positive by venous blood, yielding 84.6% sensitivity and 100% specificity, as is shown in Table 1.

**Table 1**  
Performance of dried blood spots for serological diagnosis of HCV, HBV and HDV infection in comparison with venous blood samples.

	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Anti-HCV	98.7% (93.0–99.8)	100% (97.0–100.0)	100% (95.3–100.0)	99.2% (95.6–99.9)
HBsAg	98.4% (94.4–99.6)	96.2% (89.3–98.7)	97.7% (93.4–99.2)	97.5% (91.2–99.3)
Anti-HBc	95.9% (91.3–98.1)	100% (93.6–100)	100% (97.4–100.0)	90.3% (80.5–95.5)
Anti-HDV	84.6% (57.8–95.7)	100% (88.3–100)	100% (77.2–100.0)	93.5% (71.7–100.0)

Anti-HCV: antibodies against hepatitis C virus; HBsAg: hepatitis B surface antigen; Anti-HBc: antibodies against hepatitis B core antigen; Anti-HDV: antibodies against hepatitis Delta virus; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value.

### 3.2. Hepatitis B, C, and D virologic results

Seventy-eight (61.9 %) of 126 HBsAg-positive patients had quantifiable HBV-DNA by conventional analysis, and only 42 (33.3 %) of the 126 by DBS. Analysis of the DBS sample provided viremia results in around half (53.8 %) of those 78 patients with quantifiable viremia in venous blood. Mean viremia level was  $2.8 (\pm 2.1) \log \text{IU/mL}$  by conventional sample testing and  $1.2 (\pm 1.8) \log \text{IU/mL}$  by DBS testing. HBV DNA was  $1.6 \log \text{IU/mL}$  lower in DBS than venous blood, with a high correlation between the 2 samples ( $R = 0.89$ ). Correlations between venous and capillary viral load in HBsAg-positive patients are shown in Fig. 2. Twenty-two of 23 patients (95.7 %) with HBV DNA  $> 2000 \text{ IU/mL}$  ( $3.3 \log \text{IU/mL}$ ) in venous blood samples had detectable viremia by DBS, which yielded an excellent correlation ( $R = 0.95$ ).

HCV-RNA was quantified by venous blood analysis in 26 (33.7 %) of 77 anti-HCV-positive samples, including the 2 samples from patients with HBV–HCV coinfection. Median viral load was  $6.54 \log \text{IU/mL}$  (IQR 5.96–6.74). In all these cases HCV RNA was also quantified by PSC-DBS, with a mean value of  $4.8 \log \text{IU/mL}$  (IQR 3.97–5.27). The HCV-RNA correlation between the two samples was excellent ( $R = 0.98$ ), showing a mean difference of  $1.1 \log \text{IU/mL}$  between the values obtained (Fig. 3). Comparison of HBV and HCV viremia levels in venous blood and DBS are shown in Fig. 4.

Among the 13 anti-HDV-positive samples, 10 (77 %) had quantifiable HDV-RNA on conventional testing and 7 (53.8 %) were also quantified on DBS testing. Analysis of the DBS sample provided viremia results in 70 % of those 10 patients with quantifiable viremia in venous blood. The mean HDV RNA level was  $4.2 (\pm 2.6) \log \text{IU/mL}$  in venous blood samples and  $2.8 (\pm 1.99) \log \text{IU/mL}$  in DBS samples. The mean difference in HDV RNA between venous blood and DBS was  $1.12 (\pm 1.04) \log \text{IU/mL}$ , with a very high correlation ( $R = 0.96$ ) as shown in Fig. 5. The sensitivity, specificity, and predictive values with 95 % confidence intervals of DBS compared to conventional sample testing for the virologic diagnosis are summarized in Table 2.

### 3.3. Prospective study in Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal (Angola)

In total, 93 individuals were included in the prospective study carried out in Cubal (Angola): mean age was  $40.5 (\pm 13.4)$  years and 57 (61.3 %) were women. Regarding risk factors, 15 (16.1 %) had received a blood transfusion, 7 (7.5 %) had skin tattoos, 11 (11.8 %) reported sexual risk behavior, 16 (17.2 %) had undergone surgery, 35 of 36 (97.2 %) men had been circumcised, 43 (46.2 %) reported at least 1 episode of scarification, and 61 (65.6 %) remembered at least 1 episode of jaundice. None reported injection drug use.

HBsAg was detected in PSC-DBS samples in 10 (10.8 %) individuals.

Four (40 %) were men, with a median age of 32.5 [25–54] years. Three HBsAg-positive (30 %) individuals were younger than 25 years, 4 (40 %) between 25 and 50 years, and 3 were older than 50 years. HBV-DNA was detected in 6 of the 10 HBsAg-positive (60 %) cases. None of the participants tested positive to anti-HCV or anti-HDV.

### 4. Discussion

Our results show that PSC-DBS testing is useful for serologic and virologic diagnosis of HCV and HBV infection, with high performance for serologic diagnosis of chronic viral hepatitis. Overall, DBS viral loads for HBV, HCV, and HDV correlated well with those obtained in plasma samples, however, there was a 1-log difference in the values between the 2 techniques. This difference can be explained by the different final plasma volume obtained from the venous blood and dried blood samples. As a result, the sensitivity of DBS in samples with viral loads less than  $1000 \text{ IU/mL}$  ( $10^3 \log$ ) may be decreased (Marins et al., 2020). The sensitivity and specificity of DBS for HBsAg detection was 96.4 % and 96 %, respectively, and for anti-HBc, 95.9 % and 100 %. The two false-negative HBsAg results by DBS corresponded to serum samples with qHBsAg below  $1 \text{ IU/mL}$ , and in both individuals, HBV DNA was undetectable by the 2 techniques. All 3 HBsAg false positive samples by DBS had very low levels of HBsAg ( $< 1 \text{ IU/mL}$ ). These false positive results may be attributable to contamination either during manual processing of the samples or during PSCs storage, drying process or submission to laboratory.

To our knowledge these are the first reported data using PSC-DBS for serologic diagnosis of HBV infection. Testing with these samples showed high reliability and the results obtained were similar to those reported with other DBS methods (Lange et al., 2017). In HBeAg-negative patients, the majority HBV population in our study, the sensitivity of PSC-DBS to detect HBV DNA was low (53.8 %) and differed from the findings in previous studies (Jardi et al., 2004; Mohamed et al., 2013; Jackson et al., 2019; Ross et al., 2013). These differences can be explained by the high prevalence of chronic HBeAg-negative infections in our patients, and as a consequence, the low HBV-DNA titers. However, this limitation would not have an impact on selection of patients eligible for HBV therapy; that is, those with HBV-DNA levels  $> 2000 \text{ IU/mL}$  ( $3.3 \log$ ) (Lampertico et al., 2017). In this situation, the sensitivity of PSC-DBS increased to almost 96 % and showed a high correlation with conventional venous blood testing ( $R = 0.95$ ). Overall, our results show that HBV-DNA testing by PSC-DBS can be useful for screening and selecting individuals who could benefit from treatment in settings where virologic assessment is not easily accessible, as has been suggested previously (Allain and Opare-Sem, 2016). Our pilot study in Angola provides evidence that this is a feasible approach.

Sensitivity for the detection of anti-HCV antibodies was 98.7 % with 100 % specificity; hence, our results are similar to previous findings and support the use of PSC-DBS as an alternative sample option for HCV diagnosis (Soulier et al., 2016). The single false-negative result, a non-viremic anti-HCV sample by venous blood and DBS, is likely related to the low anti-HCV titers in individuals with resolved infection. HCV-RNA testing by PSC-DBS yielded 100 % sensitivity, detecting all 26 viremic samples with a strong correlation (0.98). These results are similar to those of a previous study, in which high sensitivity for HCV-RNA detection (100 %) was obtained by PSC-DBS, with a correlation of 0.89 (Matins et al., 2020). In contrast to HBV infection, HCV viral load is usually stable at  $4–8 \log^{10} \text{ IU/mL}$  in untreated patients (Ticehurst et al., 2007), and it has been estimated that HCV-RNA levels are  $< 10^3 \log$  in only 1% of viremic HCV patients (Rando-Segura et al., 2020). Therefore, although our study population did not include individuals with a low HCV-RNA viral load, we can assume that, in general, DBS would be a reliable tool for HCV virologic diagnosis. It should be mentioned that lower HCV-RNA viral loads have been described in younger people, HBV coinfected patients, people who inject drugs (PWID), and prison inmates (Ticehurst et al., 2007; Rando-Segura et al.,

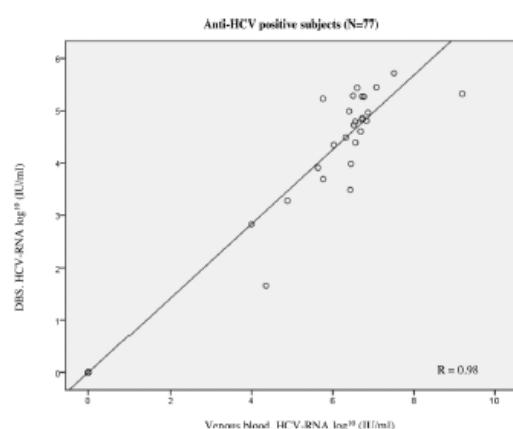


Fig. 2. HCV-RNA correlation between venous blood and DBS.

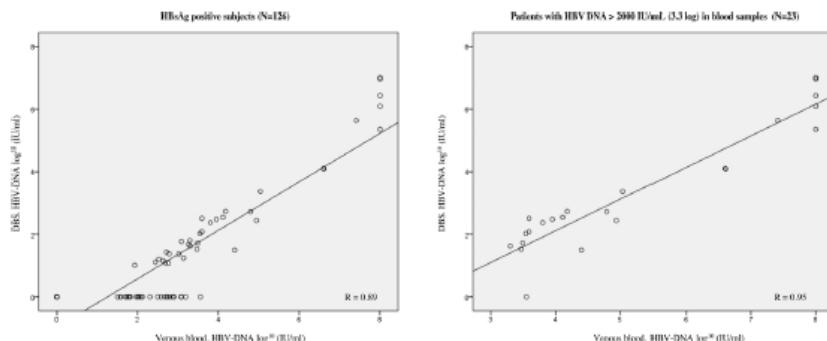


Fig. 3. HBV-DNA correlation between venous blood and DBS.

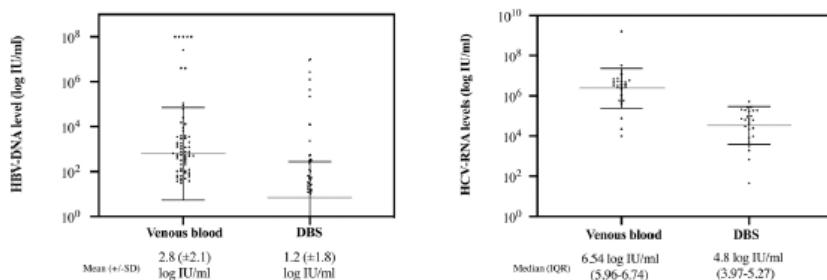


Fig. 4. Comparison of HBV-DNA and HCV-RNA levels between venous blood and dried blood spot (DBS).

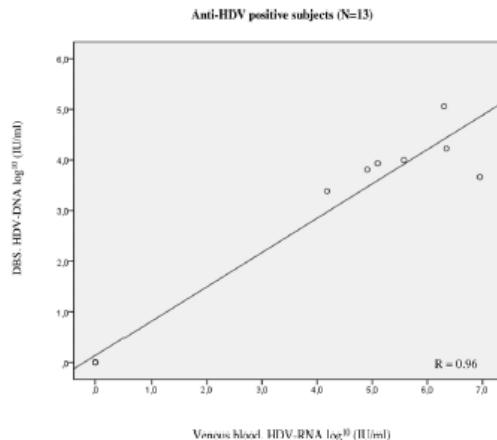


Fig. 5. HDV-RNA correlation between venous blood and DBS.

2020).

Sensitivity for anti-HDV was lower (84.6 %) than that of the other serologies, likely due to the small number of anti-HDV-positive patients included. The two false-negative results corresponded to non-viremic samples by venous blood and DBS. The sensitivity of PSC-DBS testing compared with venous samples for HDV-RNA was 70 %, with a correlation of 0.96. The relatively low sensitivity may be explained by the use of an in-house PCR technique for the analyses with a lower limit of detection of  $5.75 \times 10^2$  IU/ml.

Use of DBS samples proved to be a suitable strategy for hepatitis screening in an African community, the essential first step in linkage to a health improvement. Although the sample was small, this pilot study led

**Table 2**  
Performance of dried blood spots for virologic diagnosis of HCV, HBV and HDV infection in comparison with venous blood samples.

	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)	PPV (95 % CI)	NPV (95 % CI)
HBV-DNA	53.8 % (42.3–64.5)	100 % (90.4–100.0)	100 % (91.6–100.0)	57.1 % (46.5–67.2)
HBV-DNA > 2000 IU/ml (3.3 log)	95.7 % (79.0–99.2)	100 % (93.6–100.0)	100 % (85.1–100.0)	98.2 % (90.7–99.7)
HCV-RNA	100 % (87.1–100.0)	100 % (93.0–100.0)	100 % (87.1–100.0)	100 % (93.0–100.0)
HDV-RNA	70 % (39.7–89.2)	100 % (43.9–100.0)	100 % (64.6–100.0)	50 % (18.7–81.2)

HBV-DNA: hepatitis B virus deoxyribonucleic acid; HCV-RNA: hepatitis C virus ribonucleic acid; HDV-RNA: hepatitis D virus ribonucleic acid; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value; IU/ml: International Unit per milliliter.

to detection of HBsAg-positive status in almost 11 % of the Cuban population, a prevalence similar to previous findings in Angola (Valente et al., 2010; Guimarães Nebenzahl et al., 2013). HBsAg positivity was higher at younger ages, and anti-HBc prevalence was very high (65.5 %), supporting reports of widespread HBV infection in the sub-Saharan population (Valente et al., 2010). In addition, HBV viremia was quantified in 60 % of cases. None of the HBsAg-positive individuals reported being under antiviral treatment for HIV. Exposure to risk factors for transmission of chronic viral hepatitis, such as surgery or blood transfusion, were present in more than 15 % of cases and risky sexual behavior was reported by more than 10 %. None reported injecting drug use. Previous jaundice episodes were high (65.5 %) and probably related to infections such as malaria or hepatitis A which are common in

childhood (Lemon et al., 2018). Almost half the participants had undergone skin scarification.

Our study has several limitations, including the lack of HBeAg assessment in DBS, a low number of HBeAg-positive and anti-HDV-positive patients, and an absence of HCV patients with low HCV-RNA viral load. The main limitation of PSC-DBS samples is their low sensitivity for detecting viral loads <1000 IU/mL. On the other hand, PSC samples have shown an almost complete stability of HCV-RNA/HIV-RNA after storage during 28/21 days and therefore, the recommended time to analyze PSC samples has been set in three weeks (Marins et al., 2020; Carmona et al., 2019). However, despite these limitations, our results indicate that PSC-DBS analysis can be a useful resource for serologic and virologic diagnosis of chronic viral hepatitis, especially in low-income countries and settings where other laboratory tests are not available. Our pilot experience indicates that implementation of PSC-DBS testing for this purpose in settings such as sub-Saharan Africa is viable and could be useful for screening, monitoring, and determining eligibility for treatment.

#### Ethical statement

This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained in all participants.

#### Funding

Funding sources: Primary funding source: Instituto Carlos III (Spain) PI17/02233. Roche Molecular Systems, Inc, USA. "Hepatitis C micro elimination" grant from Gilead Sciences GLD19\_0104, Spain.

#### CRedit authorship contribution statement

**Joan Martínez-Campreciós:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft. **Ariadna Rando-Segura:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **María Buti:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Project administration. **Fernando Rodrigo-Velásquez:** Methodology, Investigation. **Mar Riveiro-Barciela:** Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Ana Barreira-Díaz:** Investigation. **Patricia Álvarez-López:** Investigation. **Paula Salmerón:** Investigation. **Adriana Palom:** Investigation. **David Tabernero:** Investigation. **Nieves Palomo:** Investigation. **Arlete Nindia:** Investigation. **Gisela Barbosa:** Investigation. **Eva López:** Resources. **Vicelma Ferreira:** Investigation. **Nelsa Saiago:** Investigation. **Alison Kuchta:** Funding acquisition. **Roser Ferrer-Costa:** Investigation. **Rafael Esteban:** Investigation. **Israel Molina:** Methodology, Supervision. **Francisco Rodríguez-Friás:** Methodology, Supervision, Writing - review & editing, Project administration.

#### Declaration of Competing Interest

None declared.

#### Acknowledgment

We are grateful to the staff of Nossa Senhora da Paz Hospital in Cubal for their valuable collaboration in this study and to the department of Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona.

#### References

- Abravanel, F., Lhomme, S., Tréméaux, P., et al., 2020. Performance of the Xpert HBV Viral Load assay versus the Aptima Quant assay for quantifying hepatitis B virus DNA. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114946>. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.
- Allain, J.P., Opare-Sem, O., 2016. Screening and diagnosis of HBV in low-income and middle-income countries. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.138>. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.
- Andreotti, M., Pirillo, M., Guidotti, G., et al., 2010. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.006>. Journal of Clinical Virology.
- Carmona, S., Seiverth, B., Magubane, D., et al., 2019. Separation of Plasma from Whole Blood by Use of the cobas Plasma Separation Card: a Compelling Alternative to Dried Blood Spots for Quantification of HIV-1 Viral Load. <https://doi.org/10.1128/JCM.01336-18>. Journal of Clinical Microbiology.
- Chevaliez, S., Pawlotsky, J.M., 2018. New virological tools for screening, diagnosis and monitoring of hepatitis B and C in resource-limited settings. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.017>. Journal of Hepatology.
- Cooke, G.S., Andreu-Meyer, I., Applegate, T.L., et al., 2019. Accelerating the elimination of viral hepatitis: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30270-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30270-X). The Lancet Gastroenterology and Hepatology.
- Grebely, J., Lamoury, F.M.J., Hajarizadeh, B., et al., 2017. Evaluation of the Xpert HCV Viral Load point-of-care assay from venepuncture-collected and finger-stick capillary whole-blood samples: a cohort study. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30075-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30075-4). The Lancet Gastroenterology and Hepatology.
- Guimaraes Nebenzahl, H., Lopes, Á., Castro, R., et al., 2013. Prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, hepatitis B virus and syphilis among individuals attending anonymous testing for HIV in Luanda, Angola. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.6097>. South African Medical Journal.
- Homs, M., Giersch, K., Blaiz, M., et al., 2014. Relevance of a full-length genomic RNA standard and a thermal-shock step for optimal hepatitis delta virus quantification. <https://doi.org/10.1128/JCM.00940-14>. Journal of Clinical Microbiology.
- Jackson, K., Holgate, T., Tekoaaua, R., et al., 2019. Evaluation of dried blood spots for hepatitis B and D serology and nucleic acid testing. <https://doi.org/10.1002/jmv>. Journal of Medical Virology.
- Jardi, R., Rodríguez-Friás, F., Buti, M., et al., 2004. Usefulness of dried samples for quantification and molecular characterization of HBV-DNA. <https://doi.org/10.1002/hep.20275>. Hepatology.
- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., et al., 2017. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>. Journal of Hepatology.
- Lange, B., Cohn, J., Roberts, T., et al., 2017. Diagnostic accuracy of serological diagnosis of hepatitis C and B using dried blood spot samples (DBS): Two systematic reviews and meta-analyses. <https://doi.org/10.1101/s12879-017-2777-y>. BMC Infectious Diseases.
- Lemon, S.M., Ott, J.J., Van Damme, P., et al., 2018. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>. Journal of Hepatology.
- Marins, E.G., Krey, N., Becker, A., et al., 2020. Evaluation of the cobas® HCV test for quantifying HCV RNA in dried plasma spots collected using the cobas® Plasma Separation Card. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113820>. Journal of Virological Methods.
- Mohamed, S., Raimondo, A., Pénaranda, G., et al., 2013. Dried Blood Spot Sampling for Hepatitis B Virus Serology and Molecular Testing. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061077>. PLoS One.
- Newcombe, R.G., 1998. Two-sided confidence intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19980430\)17:3<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:3<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E). Statistics in Medicine.
- Rando-Segura, A., Buti, M., Quer, J., et al., 2020. Viral load measurements in individuals with hepatitis C virus infection: On the European Association for the study of the liver recommendations on treatment of hepatitis C 2018. <https://doi.org/10.1128/JCM.01379-19>. Journal of Clinical Microbiology.
- Ross, R.S., Stambouli, O., Grüner, N., et al., 2013. Detection of infections with hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of dried blood spots - performance characteristics of the ARCHITECT system and two commercial assays for nucleic acid amplification. <https://doi.org/10.1196/1743-422X-10-72>. Virology Journal.
- Soulier, A., Poiteau, L., Rosa, I., et al., 2016. Dried blood spots: A tool to ensure broad access to hepatitis C screening, diagnosis, and treatment. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv423>. Journal of Infectious Diseases.
- Ticehurst, J.R., Hamzeh, F.M., Thomas, D.L., 2007. Factors affecting serum concentrations of hepatitis C virus (HCV) RNA in HCV genotype 1-infected patients with chronic hepatitis. <https://doi.org/10.1128/JCM.02448-06>. Journal of Clinical Microbiology.
- Valente, F., do Lago, B.V., de Castro, C.A.V., et al., 2010. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800004>. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.
- World Health Organization, 2016. Global Hepatitis Programme Department of HIV/AIDS 2016. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021.
- Yoon, C., Cattamanchi, A., Davis, J.L., et al., 2012. Impact of Xpert MTB/RIF Testing on Tuberculosis Management and Outcomes in Hospitalized Patients in Uganda 7, e49599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049599>. PLoS One.

## 10.3 Publicación 3

Vargas-Accarino E, Martínez-Campreciós J, Domínguez-Hernández R, et al. Cost-effectiveness analysis of an active search to retrieve HCV patients lost to follow-up (RELINK-C strategy) and the impact of COVID-19. *J Viral Hepat.* 2022;29(7):579-583. doi:10.1111/jvh.13686



Received: 22 December 2021 | Revised: 25 March 2022 | Accepted: 1 April 2022  
DOI: 10.1111/jvh.13686



SHORT COMMUNICATION

### Cost-effectiveness analysis of an active search to retrieve HCV patients lost to follow-up (RELINK-C strategy) and the impact of COVID-19

Elena Vargas-Accarino<sup>1,2</sup> | Joan Martínez-Campreciós<sup>1,2</sup> |  
Raquel Domínguez-Hernández<sup>3</sup> | Ariadna Rando-Segura<sup>4,5</sup> | Mar Riveiro-Barciela<sup>1,2,6</sup> |  
Francisco Rodríguez-Frías<sup>6,7,8</sup> | Ana Barreira<sup>1,2</sup> | Adriana Palom<sup>1,2</sup> |  
Miguel Ángel Casado<sup>3</sup> | Rafael Esteban<sup>1,6</sup> | María Buti<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Liver Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Pharmacoeconomics & Outcomes Research Iberia (PORIB), Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>6</sup>CIBERehd, Instituto Carlos III, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Biochemistry and Microbiology Department, Clinical Laboratories Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Liver Pathology Unit, Biochemistry and Microbiology Departments, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

#### Correspondence

Maria Buti, Liver Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain.

Email: [mbuti@vhebron.net](mailto:mbuti@vhebron.net)

**Funding information:** This study has an unrestricted grant by Gilead Sciences.

**Keywords:** cost-effectiveness analysis, COVID-19 pandemic, hepatitis C elimination, linkage to care, lost to follow-up patients

#### 1 | INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection affects 71 million people worldwide. The World Health Organization (WHO) has set a goal of HCV elimination by 2030, and this implies that 90% of HCV cases must be diagnosed and 80% treated.<sup>1</sup> To improve the diagnosis of HCV, a one-step approach (HCV-RNA reflex testing) was introduced in the Spanish National Health System in 2018. A high proportion of patients with diagnosed HCV infection (mainly psychiatric or dependency individuals) are lost to follow-up (LTFU), likely because of asymptomatic and silent progression of the disease. Retrieval of these patients for treatment could stop further progression of liver disease, reduce the number of infected individuals, and serve as secondary prevention, by averting ongoing transmission.<sup>2</sup>

The ReLink-C strategy was based on a retrospective search for HCV-RNA-positive cases from the central laboratory of Barcelona area between 2019 and 2021 and included the COVID-19 pandemic. The impact of the COVID-19 pandemic on global efforts for HCV elimination has been evaluated in several studies,<sup>3</sup> which show that a one-year delay in HCV elimination programs is associated with an increase in the number of hepatocellular carcinoma (HCC) cases and liver-related mortality in the next years.<sup>4</sup>

The aims of this study were as follows: (1) identify and retrieve individuals previously diagnosed with HCV infection who were lost to medical follow-up, and linked them to care; (2) assess the impact of the COVID-19 pandemic on the rates of HCV-positive patient retrieval and linkage to care; and (3) evaluate the cost-effectiveness of this strategy.

**Abbreviations:** ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; DAA, direct-acting antivirals; HCV, Hepatitis C virus; LTFU, Lost to follow-up; RNA, Ribonucleic acid.

Elena Vargas-Accarino and Joan Martínez-Campreciós authors are contributed equally to the study.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](#) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Viral Hepatitis* published by John Wiley & Sons Ltd.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

ReLink-C study has a first retrospective phase, focused in identifying HCV-RNA-positive cases and a medical records review. The following individuals were excluded as follows: those deceased, those already treated, those with life-threatening comorbidities or those lacking contact information. The interventional second phase was focused on individuals who had been LTFU. They were called a maximum of five times and sent appointment reminders by post when telephone contact failed. Successfully contacted individuals were informed about our retrieval project and HCV therapy.

In a one-step visit, a hepatologist recorded the medical history, HCV-RNA and HCV genotype were performed as well as transient elastography (TE). Severe liver fibrosis was defined by TE between 9.5 and 12.4 kPa and cirrhosis if  $\geq 12.5$  kPa. Patients with advanced fibrosis underwent abdominal ultrasound. DAA therapy was offered to all patients with active infection.

### 2.1 | Cost-effectiveness analysis

An economic evaluation was performed to estimate the cost-effectiveness of ReLink-C compared with no intervention. ReLink-C cost was calculated as the sum of the cost of healthcare resources for the HCV diagnosis and linkage to care.

The impact on healthcare and economic outcomes of ReLink-C vs no intervention were estimated using a previously reported Markov model<sup>15</sup> to simulate the evolution of chronic HCV through different health states over the patient's lifetime. The mean age of patients entering the model was 57 years according to our study data, and the distribution between the different health states and sustained virological response (92–97%) was obtained from official data.

### 2.2 | Statistical analysis

Relink strategies and linkage to care were compared for the two 14-month time periods before and after emergency response policies were implemented on 13 March 2020. Descriptive statistics were used to show the differences between the number of patients LTFU who were retrieved and tested in the pre-COVID and the COVID-19 period. Statistical analyses were made with EPI DAT 3.1 software. Qualitative data were compared using the chi-squared test or the Fisher exact test when frequencies were  $< 5$ .

### 2.3 | Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospital and was conducted following good clinical

practice guidelines. All data were processed confidentially in an anonymous database accessible only to the researchers, in keeping with Spanish legislation.

## 3 | RESULTS

In total, 1591 HCV-RNA-positive patients were identified. Among them, 599 (37.6%) had already been treated or linked to care, 78 (5%) had died, and 914 (57.4%) had been LTFU and were selected for retrieval. Within the latter, 166 were candidates for contact. Those who were not eligible to be contacted included 379 (41%) with a limited life expectancy, life-threatening disease, or HCV treatment contraindication, and 369 (40%) lacking contact details. After a maximum of 5 telephone calls, 104 of the 166 candidates (63%) were located, and 51 (50%) agreed to an appointment (29 refused a medical visit, 23 were already treated, and 1 had died). Finally, 43 patients attended the appointment (84%) and 41 were treated (95%) (2.5% of the 1591 HCV-RNA-positive individuals identified). A flowchart of the results during the two periods (pre-COVID-19 and COVID-19) is shown in [Figure 1A](#).

During the COVID-19 period, a lower percentage of patients had been linked to care (27% vs 43%;  $p < 0.0001$ ), and therefore, a higher percentage were selected for retrieval (70% vs 51%;  $p < 0.0001$ ). In contrast, in the pre-COVID-19 period, a lower percentage were candidates for contact (5% vs 13%;  $p < 0.0001$ ) due to a limited life expectancy or comorbidities, and a lower percentage were located (3.3% vs 8%;  $p < 0.005$ ). At the end of the analysis, however, a similar percentage of cases started treatment in the two groups (2.4% vs 2.7%;  $p < 0.7239$ ).

Patients treated with DAA were mainly men (58.5%), mean age 54 years, 10 (25%) had advanced fibrosis and 15 were infected by genotype 1 (37%).

### 3.1 | Cost-effectiveness analysis

The cost of diagnosing all patients who attended the medical visit was €19,924. Therefore, the total investment of the ReLink-C strategy was €26,075. In the Markov model lifetime simulation, 141 HCV-RNA-positive patients were included (166 candidates to contact excluding 23 already treated, 1 death, and 1 spontaneous cure). Based on our results, treating 41 patients with DAA vs no patients treated (no intervention) reduced decompensated cirrhosis cases by 30%, HCC by 27%, and liver transplantation requirement by 20%. HCV-related deaths decreased by 26%. The reduction in liver complications generated a cost-saving of €456,796 ([Figure 1B](#)).

## 4 | DISCUSSION

The ReLink-C strategy enabled identification of a substantial percentage of HCV patients LTFU and provided linkage to care. With

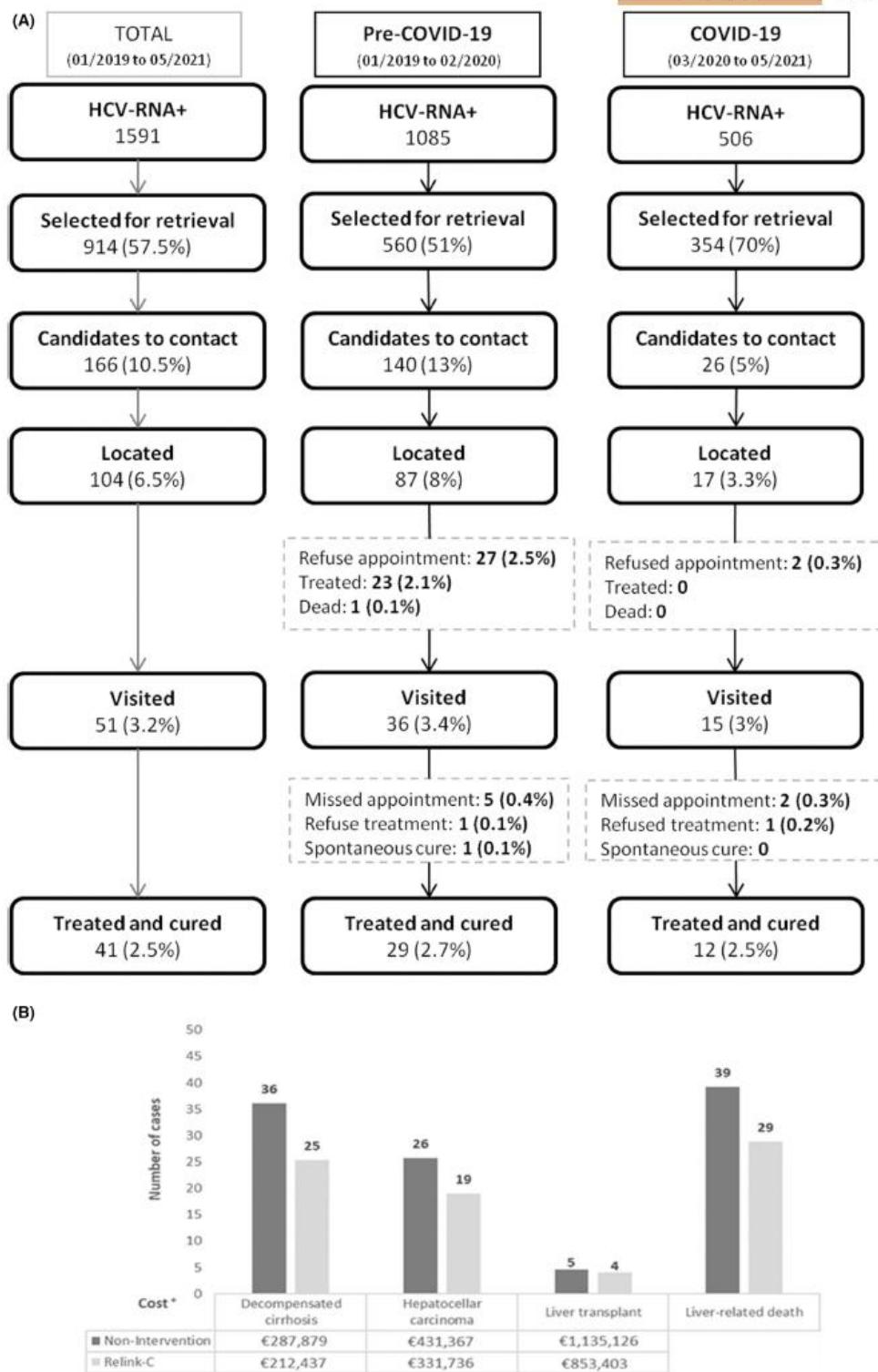


FIGURE 1 (A) Flowchart of ReLink-C strategy for the total period and comparison of pre-COVID and COVID periods. (All percentages are calculated from the total number of HCV-positive patients identified). Abbreviations: HCV: Hepatitis C virus; RNA: Ribonucleic acid; DAA: Direct acting antivirals. (B) Number of cases of liver complications, mortality and costs projected over the patients' lifetime

this case-finding approach, we can prevent potentially severe complications, and reduce further transmission, thereby contributing to HCV elimination. In total, 1591 HCV-RNA-positive tests were reviewed, 166 patients were candidates for retrieval, and 25% of these individuals could be relinked to care and cure.

In a similar study in Utrecht,<sup>6</sup> among 1913 individuals with HCV infection, 269 were LTFU and eligible for retrieval. After contacting them by letter, 15.5% of candidates were treated, a lower percentage than in our strategy (25%); suggesting that a phone call may be more effective than a letter for this purpose. In another study,<sup>7</sup> 499 HCV cases were identified and 3 started DAA (12.5%). In this study, patients were contacted by primary care physicians, a possible reason for the lower rate of linkage to care. Finally, in a study performed in 2 centers in France,<sup>8</sup> more than 95% of candidates were contacted, due to an active search strategy in which the primary care physicians were involved.

The approach used in our study has several strengths. First, the use of universal reflex HCV-RNA testing. Second, the simplified care circuit model to assess liver disease. In a single medical visit, HCV-RNA testing and TE were performed, allowing initiation of DAAs. Of the 43 individuals who attended the appointment, 41 started treatment (>95%).

A novel finding of this study is the observation that during the COVID-19 period, a lower percentage of patients were linked to care (27 vs 43%), and consequently, more patients were selected for retrieval (70 vs 51%). Nevertheless, the percentage of candidates to contact was lower in the COVID-19 period, as there was a higher percentage of patients with comorbidities or with a limited life expectancy (33% vs 54%). A higher percentage of patients was located (65% vs 62%) among candidates to contact during the COVID-19 pandemic, and a larger number of patients located attended the physician's appointment (88% vs 41%) than during pre-COVID-19.

Another significant finding to point out is the result of the cost-effectiveness analysis, which showed a cost-saving of €456,796 for the public health system because of the estimated reductions in liver disease complications and mortality.

Our study has the limitations of a retrospective design. After the records search, a large percentage of patients could not be contacted due to lacked contact information, a problem observed in other similar studies.<sup>6,7</sup> In addition, a large geographic area was covered, and the hospitals, primary care centers and drug addiction centers did not have a common record system.

To summarize, individuals with HCV LTFU can be effectively retrieved through the Relink-C strategy. From the individual's viewpoint, linkage to care enhances HCV cure and from the public health perspective, this strategy contributes to reduce hepatitis C transmission and enables HCV elimination. Although the COVID-19 pandemic had a relevant impact on linkage to care and treatment, the Relink-C strategy retrieved and treated a considerable number of formerly lost patients

and proved to be a cost-effective approach in a publically funded universal health system.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Elena Vargas-Accarino, Joan Martínez-Campreciós, Ariadna Rando-Segura and María Buti performed the research. Raquel Domínguez-Hernández and Miguel Ángel Casado analysed the data. Elena Vargas-Accarino, Joan Martínez-Campreciós, Raquel Domínguez-Hernández and María Buti designed the research study and wrote the manuscript. Mar Riveiro-Barciela, Francisco Rodríguez-Friás, Ana Barreira, Adriana Palom and Rafael Esteban contributed to the design of the study. All authors reviewed and approved the final version of the paper.

## CONFLICT OF INTEREST

Raquel Domínguez-Hernández and Miguel Ángel Casado are employees of Pharmacoconomics & Outcomes Research Iberia, a consultancy firm specializing in the economic evaluation of health-care interventions, which has received unconditional funding from Gilead Sciences for the development of the analysis. Dr Mar Riveiro-Barciela has served as a speaker of Gilead Sciences and Abbvie. Prof. Rafael Esteban has served as a speaker and advisory board of Gilead Sciences and Abbvie. Prof. María Buti has served as a speaker and advisory board of Gilead Sciences and Abbvie.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Elena Vargas-Accarino  <https://orcid.org/0000-0002-2521-0368>  
Joan Martínez-Campreciós  <https://orcid.org/0000-0002-8899-8447>  
Raquel Domínguez-Hernández  <https://orcid.org/0000-0003-1083-7288>  
Mar Riveiro-Barciela  <https://orcid.org/0000-0001-9309-2052>  
María Buti  <https://orcid.org/0000-0002-0732-3078>

## REFERENCES

1. World Health Organization. *Global Hepatitis Report*. World Health Organization; 2017.
2. Isfordink CJ, Brakenhoff SM, Van Dijk M, et al. Hepatitis C elimination in The Netherlands (CELINE): study protocol for nationwide retrieval of lost to follow-up patients with chronic hepatitis C. *BMJ Open Gastroenterol*. 2020;7(1):1-6.
3. Buti M, Domínguez-Hernández R, Casado MÁ. Impact of the COVID-19 pandemic on HCV elimination in Spain. *J Hepatol*. 2021;74(5):1246-1248.
4. Blach S, Kondili LA, Aghemo A, et al. Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts. *J Hepatol*. 2021;74(1):31-36.
5. Turnes J, Domínguez-Hernández R, Casado MÁ. Cost-effectiveness analysis of two treatments strategies for chronic hepatitis C before and after access to direct-acting antivirals in Spain. *Gastroenterol Hepatol*. 2017;40(7):433-446.

6. Kracht PAM, Arends JE, van Erpecum KJ, et al. Retrieval and cure of chronic hepatitis C (REACH): results of micro-elimination in the Utrecht province. *Liver Int.* 2019;39(3):455-462.
7. Beekmans N, Klemt-Kropp M. Re-evaluation of chronic hepatitis B and hepatitis C patients lost to follow-up: results of the northern Holland hepatitis retrieval project. *Hepatol Med Policy*. 2018;3(1):1-6.
8. Métivier S, Foucher J, Maguin M, et al. Recall of HCV patients lost to follow-up. ReLink study in two expert centers in France [abstract 888]. *Hepatol*. 2020;72(1):542-543.

How to cite this article: Vargas-Accarino E, Martínez-Campreciós J, Domínguez-Hernández R, et al. Cost-effectiveness analysis of an active search to retrieve HCV patients lost to follow-up (RELINK-C strategy) and the impact of COVID-19. *J Viral Hepat*. 2022;00:1-5. doi: [10.1111/jvh.13686](https://doi.org/10.1111/jvh.13686)