



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

TITULO:

**“Caracterización Molecular de las Infecciones por VHC
Genotipo 1 y 4 en Pacientes Coinfectados con VIH”**

TESIS

Que para optar por el grado de:

Maestro en Ciencias Médicas y de la Salud

PRESENTA:

Dr. Bruno Ali López Luis

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA:

Dr. Carlos Aguilar Salinas

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México, junio 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Aprobación de tesis:

La presente Tesis cuenta con la calidad y originalidad requerida para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Médicas y de la Salud.



Dr. Carlos Aguilar Salinas

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADEMICA

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dr. Bruno Ali López Luis

ALUMNO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

TITULO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS INFECCIONES POR VHC GENOTIPO 1 Y 4 EN PACIENTES COINFECTADOS CON VIH

Autor

Alumno: DR. BRUNO ALI LOPEZ LUIS

Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Comité tutorial

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Jefe del laboratorio de Virología Molecular e investigador titular del departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Dr. Ignacio García Juárez

Adscrito al departamento de Gastroenterología e investigador titular

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

COLABORADOR:

Biólogo. **Roberto A. Rodríguez Díaz**

Laboratorio de Virología Molecular

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

INDICE

1. RESUMEN	03
2. MARCO TEORICO	07
3. JUSTIFICACIÒN	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO	19
6. MATERIALES Y METODOS	21
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSION Y CONCLUSIONES	39
9. BIBLIOGRAFIA	44
10. APENDICE 1	54

1. RESUMEN

Objetivo: El objetivo fue hacer una caracterización molecular de los aislamientos de virus de la hepatitis C (VHC) para evaluar la frecuencia y los factores asociados a variantes asociadas a resistencia (RAVs) a los inhibidores NS5A en pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además un grupo de pacientes con mono infección por VHC. Los pacientes incluidos fueron del genotipo 1b (GT1b), el genotipo 1a (GT1a) y genotipo 4 (GT4). Realizamos un análisis filogenético para evaluar el patrón de agrupamiento entre muestras de pacientes con RAVs así como determinar redes de transmisión. En cuanto a la reciente emergencia de GT4 un posible origen geográfico y tiempo de introducción en nuestro país fue determinado molecularmente.

Metodos: Durante el periodo 2016-2019 los pacientes con infección por VHC con GT1 o con GT4 (recientemente determinado en nuestra clínica) atendidos en el INCMNSZ fueron incluidos. Muestras de plasma y datos clínicos de su expediente clínico fueron extraídos. Secuenciaciones de la región NS5A y en el caso de GT4 adicionalmente se secuenció 5'UTR y NS5B. Un análisis filogenético fue realizado con secuencias recuperadas de GenBank de cada genotipo respectivamente y de varias partes del mundo. Un análisis bivariado y multivariado fue realizado para encontrar factores asociados a RAVs (GT1)

Resultados: Cincuenta y cinco pacientes estaban infectados con GT1a, de los cuales 44 (80%) eran pacientes infectados por VIH. La prevalencia de RAVS en GT1a fue del 14% (6/44) y se distribuyó de la siguiente manera: 5 (11%) albergaron M28V y 1 (2%) A92T. Veinticuatro pacientes estaban infectados con HCV GT1b, de los cuales solo 5 (21%) estaban coinfectados por VIH; Se encontraron RAVs en 17/24 (71%) pacientes, de la siguiente manera: Y93H + F37L + Q54H (1/24), Y93H + F37L (1/24), P58S (1/24), L31F + F37L (1/24), F37L + H / Q54H (3/24) y F37L (10/24). Sólo GT1b se asoció significativamente con RAVS (aOR16,37; IC 95% 2,74–97,48; $P = 0,002$) en el análisis multivariado. Se encontró un cluster de secuencias de pacientes con VIH / VHC GT1a; sin embargo, no encontramos relaciones filogenéticas entre secuencias con NS5A RAVs. Catorce pacientes tuvieron infección VIH/VHC GT4 que subtipificó 4d, todos tuvieron

estrecha relacion filogenetica que sugieren redes de transmision entre ellos (mediana de distancia genetica 0.009 substituciones por nucleotido). La relacion genetica mas estrecha fue con un aislado GT4d Frances, el analisis de reloj molecular sugiere una reciente introduccion de GT4d en la ciudad de mexico en Septiembre 2015 (IC 95, Octubre 2002-Diciembre 2015).

Conclusiones: En nuestra población de pacientes infectados por el VHC, la frecuencia de NS5A RAVs basales fue algo similar a la tasa mundial reportada previamente. HCV GT1b mostró la asociación más significativa de albergar NS5A RAVs. Es de destacar que, a pesar de que existen agrupaciones entre las secuencias de pacientes coinfectados por VIH/VHC GT1a, no se transmitieron los RAVs NS5A. La reciente introduccion de VHC GT4d es debida a transmision sexual en pacientes coinfectados con VIH, probablemente con un origen filogenetico en francia donde este genotipo es endemico. Dirigir medidas preventivas en este grupo de poblacion es una urgente necesidad de salud publica.

1. ABSTRACT

Objective: The objective was to carry out a molecular characterization of HCV ge isolates to evaluate the frequency and factors associated with resistance-associated variants (RAVs) to NS5A inhibitors in patients co-infected by the human immunodeficiency virus (HIV) and a group of patients with hepatitis C virus (HCV) monoinfection with genotype 1b (GT1b), genotype 1a (GT1a) and genotype 4 (GT4). In addition, we performed a phylogenetic analysis to evaluate the clustering pattern between samples of patients with ARVs as well as to determine transmission networks. Regarding the recent emergence of GT4, a possible geographical origin and time of introduction in our country was determined molecularly.

Methods: During the 2016-2019 period, patients with HCV infection with GT1 or with GT4 (recently determined in our clinic) treated at INCMNSZ were included plasma samples and clinical data from their clinical records were extracted. Sequencing of the NS5A region and in the case of GT4 additionally 5'UTR and NS5B was performed. A phylogenetic analysis was performed with sequences retrieved from GenBank of each genotype respectively and from various parts of the world. A bivariate and multivariate analysis was performed to find factors associated with RAVs (GT1)

Results: Fifty-five patients were infected with GT1a, of which 44 (80%) were HIV-infected patients. The prevalence of RAS in GT1a was 14% (6/44) and was distributed as follows: 5 (11%) harbored M28V and 1 (2%) A92T. Twenty-four patients were infected with HCV GT1b, of which only 5 (21%) were coinfecting with HIV; RAS were found in 17/24 (71%) patients, as follows: Y93H + F37L + Q54H (1/24), Y93H + F37L (1/24), P58S (1/24), L31F + F37L (1 / 24), F37L + H / Q54H (3/24) and F37L (10/24). Only GT1b was significantly associated with RAS (adjusted odds ratio 16.37; 95% confidence interval 2.74–97.48; $P = 0.002$) in multivariate analysis. A group of sequences from patients with HIV / HCV GT1a was found; however, we did not find any phylogenetic relationships between sequences with NS5A RAS. Fourteen patients had HIV / HCV GT4 infection that subtype 4d, all had a close phylogenetic relationship that suggested transmission networks between them (median genetic distance 0.009

substitutions per nucleotide), the closest genetic relationship was with a French GT4d isolate, evolution analysis molecular suggests a recent introduction of GT4d in September 2015 (95 CI, October 2002-December 2015)

Conclusions: In our HCV-infected patient population, the frequency of NS5A RAS at baseline was somewhat similar to the previously reported global rate. HCV GT1b showed the most significant association to harbor NS5A RAS. It is noteworthy that, although there are clusters between the sequences of patients coinfecting with HIV / HCV GT1, the RAS NS5A were not transmitted. The recent introduction of HCV GT4d is due to sexual transmission in patients coinfecting with HIV, probably with a phylogenetic origin in France where this genotype is endemic. Directing preventive measures in this population group is an urgent public health need.

2. Marco Teórico

Epidemiología

El virus de hepatitis C es un flavivirus del que actualmente se conocen 7 genotipos (1-7) con distintos subtipos, su mecanismo de transmisión es por productos sanguíneos, percutánea o sexual con una alta resistencia a antisépticos y viabilidad en objetos inanimados [1].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2015 que 71 millones de personas viven con infección crónica por virus de hepatitis C (VHC) alrededor del mundo (prevalencia global 1%), 399000 han muerto de cirrosis o carcinoma hepatocelular.[2]

Además de las secuelas relacionadas a la enfermedad hepática la infección por VHC causa comorbilidades adicionales tales como depresión, DM, ERC, crioglobulinemias. Una proporción de estas morbilidades es directamente atribuible a la infección por virus de hepatitis C y son referidas como manifestaciones extrahepáticas, estas manifestaciones son modificadas por el tratamiento antiviral [3]. En la encuesta nacional de salud mexicana de 2012 la prevalencia estimada de muestras aleatorias con ELISA para anticuerpos IgG, mostro una prevalencia de 0.27% (IC95% 0.12-0.6) [4]. En 2015 un estudio de tamizaje en la población general mexicana abarcando 2007-2014 mostro una prevalencia de 0.58% y la prevalencia de viremia (infección activa) fue de 0.39% [5]. Un estudio multicéntrico en clínicas de atención primaria en 2011 enfocado en pacientes con factores de riesgo reporto al genotipo 1a con 33% y al subtipo 1b en 21.4% [6]. En una reciente población de pacientes coinfectados con VIH la prevalencia fue de 1.5% y el genotipo más frecuente fue 1a [7]. La revisión sistemática POLARIS mostro una distribución de genotipo en México de la siguiente forma; 1a (45.4%) ,1b (24.9%), 2 (21.8%), 3 (7.2%), 4 (0.3%) 5 (0.1%) [8].

El genotipo 4 presenta la mayor diversidad genética con dieciocho subtipos (4a, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r, 4s,4t, 4u).(9)

El VHC genotipo 4 (VHC-4) tiene varias particularidades; 1) ha tenido una asociación mayor a esteatosis hepática, fibrosis hepática así como carcinoma hepatocelular principalmente en pacientes coinfectados con VIH, 2) se ha considerado difícil de tratar dado a que en los ensayos clínicos iniciales utilizando tratamientos a base de interferón tuvieron un éxito limitado, sin embargo con los nuevos agentes antivirales de acción

directa(AAD) el tratamiento es más efectivo aunque estos no han sido evaluados extensamente en el genotipo 4, como tampoco la presencia de polimorfismos asociados a resistencia a los AAD.(9)

El VHC-4 es el genotipo predominante que representa el 93,1% de las infecciones en Egipto y medio oriente. La mayoría pertenecen al subtipo 4a en el 80,6% y se ha extendido su prevalencia a países europeos como Italia, Francia, Grecia y España, con tasas de 10% a 24%. (9,10)

Las cifras de prevalencia de coinfección VIH/VHC-4 no han sido claramente reportadas sin embargo en regiones de Europa estos han representado el 23% con una asociación a transmisión sexual principalmente en hombres que tienen sexo con hombres. (11,12)

En América la infección por VHC genotipo 4 es infrecuente con solo reportes de series de casos en Estados Unidos, Canadá y Argentina, la mayoría de los cuales fueron entre inmigrantes de países endémicos y no se han encontrado pruebas de la existencia de “clusters” de transmisión específicos ni de redes de transmisión (13,14). En México este genotipo es prácticamente inexistente con algún reporte en literatura internacional representando 0.3% y en países como Colombia sin ningún dato de su prevalencia en la literatura.

La importancia de la caracterización molecular en Hepatitis C

La vigilancia molecular en hepatitis C es un auxiliar a la vigilancia epidemiológica y se enfoca en 2 principales aspectos 1) los patrones de transmisión y diseminación de la enfermedad 2) la virulencia ó capacidad de causar enfermedad (38)

El VHC es un virus RNA de una sola cadena en sentido positivo con envoltura, su genoma comprende ~9.6 kb de longitud con un solo marco de lectura que codifica una gran poliproteína, que es procesada resultando en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (9). La región 5'-UTR se usa para detección del virus debido a que es altamente conservada a través de los genotipos de VHC, mientras las región NS5B ha sido utilizada para genotipificación o para establecer relaciones genéticas al igual que la región NS5A; la región HVR1 de E2 es comúnmente usada para establecimiento de vínculos genéticos entre especies sin embargo presenta una rápida divergencia lo cual puede resultar en pérdida de los vínculos genéticos entre aislamientos. (38)(39)

Las relaciones entre variantes genéticas virales muestreadas en diferentes localizaciones a través del tiempo pueden proveer información pertinente a la salud pública que no podría obtenerse fácilmente a través de una vigilancia epidemiológica estándar, esto es debido a que los datos genéticos pueden ser usados para dilucidar patrones de transmisión usando herramientas filogenéticas, Esto ha sido evaluado en Europa entre usuarios de drogas intravenosas en pacientes coinfectados con VIH, donde el análisis filogenético de la región NS5B mostró la reciente introducción de VHC genotipo 4 en Europa y mayor número de diferentes redes de transmisión comparado a VIH,(40). Un estudio similar se llevó a cabo más recientemente en los países bajos en donde 3 distintos “clusters” monofileticos fueron encontrados cada uno con un perfil epidemiológico 1) inmigrantes Egipcios donde hepatitis C genotipo 4 es prevalente 2) usuarios de drogas intravenosas 3) pacientes con VIH con transmisión sexual entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH), mostrándose este mismo orden a través del tiempo el patrón de transmisión. En Arabia Saudita un estudio filogenético realizado secuenciando la región E1 del virus de hepatitis C reveló un estrecho vínculo de VHC 4a endémico en Egipto indicando que las intervenciones y esfuerzos de tratamiento dirigidos en contra del VHC4a deben enfocarse en población inmigrante de Egipto; en contraste VHC 4d era localmente confinado. Esto implicaría que los esfuerzos de salud pública se dirijan a modos de transmisión locales para ser más eficientes. Estos estudios recalcan el poderoso valor del análisis evolutivo temporal y geoespacial de los datos genéticos del virus para la planeación de intervenciones de salud pública.

En la literatura solo se ha estudiado en Argentina una serie de casos de infección por VHC genotipo 4 en pacientes con VIH donde su análisis filogenético mostró una importación de casos a lugares endémicos de la infección y descartó la presencia de “clusters” o redes de transmisión específicos. (14)

Los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos ofrecen una importante herramienta para verificar eventos de transmisión y han llegado a ser indispensables en la investigación de brotes como aquellos ocurridos en unidades de hemodiálisis (41) o unidades de aplicación de medicamentos parenterales o procesos dentales (42), sin embargo interpretar las diferencias entre las secuencias virales en diferentes individuos no es sencillo en el VHC por que este muta rápidamente y puede existir como una población

heterogénea de variantes estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas. La magnitud de estas diferencias depende del tiempo transcurrido de infección, lo cual se refleja finalmente en pérdida de vínculos genéticos con el caso fuente. Para tratar de evitar esta desvinculación de secuencias, se han creado múltiples técnicas que superarían a la secuenciación convencional Sanger que solo representa la población predominante, estos son: End-Point Limiting-Dilution PCR (EPLD-PCR), Mass Spectrometry (MS), Next Generation Sequencing. El mayor impacto de estas técnicas será identificar redes de transmisión de VCH entre poblaciones de alto riesgo como lo son HSH y usuarios de drogas intravenosas lo que permitirá adecuadas intervenciones preventivas y reducción de daños. Sin embargo su alto costo y dificultades para su implementación aun limitan su uso (42,43)

Los nuevos agentes antivirales de acción directa (AAD) logran una respuesta viral sostenida en más del 90% de los casos que es considerada como curación. La implementación de tratamiento en poblaciones en riesgo es una prioridad, sin embargo dado que cada genotipo tiene una respuesta diferente al tratamiento es importante documentar que genotipo se está tratando. Los datos de respuesta al tratamiento en el genotipo 4 son limitados (10), en especial en la población con VIH. Dado que en las personas portadoras de VIH, se ha demostrado una transmisión importante de resistencia a los AAD, la búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores NS5A, los cuales de más baja barrera genética entre los AAD, se hace una prioridad (44).

Otra ventaja de la identificación y caracterización molecular es la bien demostrada asociación de variantes genéticas menores con virulencia del VHC por ejemplo, la sustitución Y164F en la proteína Core del genotipo 3a se correlacionó con esteatohepatitis así como las sustituciones en posiciones de aminoácidos 70 y 91 core en el genotipo 1b fueron asociadas con desarrollo de resistencia grave a la insulina. Adicionalmente el número de las sustituciones en la región NS5A es determinante de la susceptibilidad a interferón, lo que se correlacionó inversamente con la media de carga viral y directamente con la media del nivel de ALT (38).

Variantes asociadas a resistencia (RAVs) a los nuevos Agentes Antivirales de Acción Directa.

El VHC tiene una alta tasa de recambio de 10^{10} a 10^{12} viriones producidos por día. La RNA polimerasa dependiente de RNA del VHC tiene pobre fidelidad con una tasa de error de 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación genómica. Por lo tanto la población viral en una infección crónica por VHC existe como “quasispecies”.(15)

La infección por VHC tiene una distribución de quasispecies el cual se refiere a una compleja mezcla de poblaciones virales genéticamente distintas, pero estrechamente relacionada, sus respectivas proporciones dependen sobre su capacidad de replicación (Fitness). La población viral que constituye las quasispecies difieren por polimorfismos de aminoácidos que emergen por mutaciones durante la replicación y son subsecuentemente seleccionadas, esto pueden conferir una susceptibilidad reducida a los AAD, cuando un AAD es administrado la selección positiva de variantes virales con estos polimorfismos define la resistencia viral. Estas sustituciones de aminoácidos que confieren una reducida susceptibilidad a un AAD se conocen como variantes asociadas a resistencias (RAVs).(16)

La resistencia del VHC a los AAD es determinada por 3 factores: 1) La barrera genética para la resistencia relacionado al número y tipo de sustituciones de nucleótidos requerido para la emergencia de RAVs, la barrera genética para la resistencia varía con la clase de droga y el genotipo del VHC. 2) La resistencia es también determinada por la capacidad replicativa de las poblaciones de los virus resistentes, el cual es independiente del nivel de resistencia conferido por la RAVs. 3) La resistencia es finalmente determinada por el nivel de exposición a la droga comparado con el 50% y 90% de la concentración inhibitoria in vitro.(16)

En 2016 los pacientes con infección crónica por hepatitis C son tratados con una combinación de 1 a 3 AAD con o sin Ribavirina, Los inhibidores NS5B tienen una alta barrera genética debido a la poca capacidad replicativa de estas variantes a nivel de la RNA polimerasa del VHC, por otro lado los inhibidores NS5A, NS5B no nucleosídicos así como los inhibidores NS3-4A son los de más baja barrera genética. Entre las sustituciones de aminoácidos conocidas que confieren un mayor nivel de resistencia se encuentran; NS5B(L159F, S282T/R L30F), NS5A (K24G/N/R, K26E, L28M/T, Q30C/D/E, R30G, L31F, P32L/S, A92K, Y93C/H/N/S), NS3-4A (V36A/C/G, Q41R, F43L, T54A/C,

V55A, Y56H, Q80K, S122R, V1581), Inhibidores NS5B no nucleosidicos (L314H, C316Y, M414T/V, C316H, S368T, M414T/V, Y448C/H, A553/V, G554S, Y555H, S556G).(17)

En los principales ensayos clínicos evaluados en la población coinfectada VIH/VHC el efecto de los RAVs ha sido variado iniciando con el estudio el estudio ALLY-2, evaluó la región NS5A de VHC, al basal en todos los pacientes por secuencias basadas en población (sensibilidad de 20%) y también muestras fueron obtenidas en o alrededor del tiempo de falla virológica cuando el RNA del VHC fue de al menos 1000UI por mililitro.

En las muestras basales, la secuencias NS5A estuvieron disponibles para 198 pacientes, hubo polimorfismos en las posiciones asociadas con resistencia a daclatasvir (aminoácidos 28, 30,31, ó 93) y fueron observadas en 33 pacientes (17%). De 12 pacientes quienes tuvieron recaída, 6 se encontraron con polimorfismos asociados a resistencia a daclastavir (L31M, A30S, Y93N, Q30R y Q30E).(18)

En el estudio ION-4 se realizó secuenciación profunda de la región NS5A previo al inicio de tratamiento. También se realizó en pacientes al momento de la primer falla. Previo al inicio de tratamiento 59 de 325 pacientes (18%) con genotipo 1 tenían RAVs a NS5A que confieren baja susceptibilidad a Ledipasvir de estos 55 (93%) tuvieron una respuesta virológica sostenida, 2 pacientes tuvieron falla virológica en el tratamiento no presentaron RAVs basales pero tuvieron RAVs emergentes al momento de la falla virológica. 10 pacientes con recaída virológica RAVs a NS5A fueron detectados en 4 pacientes al basal y 8 pacientes al tiempo de la recaída.(19)

En el estudio ERADICATE en el único paciente con recaída la secuenciación profunda revelo RAVs en la región NS5A, el paciente presento subpoblaciones con 58% de mutaciones Y93H al basal, 89% al día 3 de tratamiento y más de 99% a la recaída.(20)

En el estudio C-WORTHY la tasa de falla virológica fue de 4% (7/188); 3 sobre tratamiento y 4 recaídas, se examinaron las secuencias del RNA de los pacientes antes del tratamiento y al tiempo de la falla virológica para búsqueda de RAVs. Al basal 35% (75/216) pacientes tuvieron RAV en NS3 en ellos la tasa de RVS fue de 91% (68/75) comparado con 92%(130/141) de pacientes sin RAV. En la evaluación de RAVs de NS5A se encontraron en 12%(25/216 de pacientes al basal de los cuales 68%(17/25) consiguieron una RVS a las 12 semanas comparado a 95%(181/191) sin RAVs los RAVs mas frecuentes detectados fueron NS3:Y56H, A156T y D168A/N, NS5A: Q30R/H,L31M, y Y93H/N.(21)

En el estudio C-EDGE CO-INFECTION las RAVs basales a NS3 fueron detectados en 74 (41%) de 182 pacientes con genotipo 1, 69 (50%) de 139 pacientes con genotipo 1a tuvieron RAVs en el gen NS3 comparado con solo 5 (12%) de los 43 pacientes con genotipo 1b. Las más mutaciones más comunes fueron Q80K/R y S122G en estos pacientes 96% con genotipo 1a y 100% de aquellos con genotipo 1b tuvieron una RVS similar con el 97% sin RAVs en el gen NS3 en las muestras basales.

La Resistencia basal a NS5A fueron detectadas en 15% de los casos, (8%) de 183 pacientes con infección por el VHC con genotipo 1, 10 (7%) de 140 con genotipo 1a y 5 (12%) de 43 con genotipo 1b. la variante más común en pacientes infectados con VHC genotipo 1a fueron (M28V; 6 pacientes), (L31M; 4 pacientes) y (T93C/H/S; 4 pacientes) y en pacientes con genotipo 1b ellos fueron Leu31Met (L31M) y Tyr93His (T93H), cada uno ocurriendo en 2 pacientes en pacientes con genotipo 1 13 de 15 pacientes con RAVs NS5A consiguieron una RVS en 87% comparado con 164 de 168(98%). En pacientes con genotipo 1a 3 de 4 tuvieron RAVs NS5A basales confiriendo más de 5 veces Resistencia a elbasvir y tuvieron una RVS de 75%,comparado con 127 of 130 (98%) sin RAVs

Los 4 pacientes con infección por VHC genotipo 1a fueron evaluados por mutaciones emergentes en el tratamiento; 2 pacientes tuvieron Asp168Ala (D168A) en la región NS3 Y 3 tuvieron Glu30Arg/Lys (Q30R/K) en la región NS5A. Para un paciente en recaída con infección por VHC con genotipo 4 se detectó un RAVs en NS5A Leu28Ser. En pacientes con genotipo 1 la RVS I fue de 87% en pacientes con RAVs NS5A basales comparado con 98% de pacientes sin estas.(22)

En el estudio TURQUOISE-I al tiempo de falla virológica 2 previos nulos respondedores a pegIFN + ribavirin tuvieron RAVs en todos los 3 agentes antivirals que fueron no presentes al basal, el paciente que recayó después de 12 semanas de tratamiento tuvieron variantes de HCV D168V in NS3, M28T, NS5A, y S556G en NS5B, y el paciente en falla sobre el tratamiento en el grupo d e 24 semanas tuvo RAVs en R155K (NS3), Q30R (NS5A) y S556G (NS5B)(23)

En el reciente estudio ASTRAL-5 en los subanálisis de estratificación por grupo aquí los RAVs basales no influyeron el respuesta logrando 100% de RVS en pacientes con documentados RAVs a NS5A(24)

Variantes de resistencia asociados a inhibidores NS5A que ocurren naturalmente en la población coinfectada con VIH/VHC

El efecto del VHC en la historia natural de la infección por VIH permanece poco clara por el contrario la infección por el VIH tiene varios efectos adversos sobre la historia natural de la infección por VHC incluyendo los siguientes: disminución de la tasa de aclaramiento después de la infección aguda, acelerada fibrogenesis, una frecuencia incrementada de descompensación hepática y muerte, una respuesta disminuida a la terapia antiviral para el VHC y la replicación del VHC se ve aumentada (25). En un estudio comparando los niveles de RNA del VHC antes y después de la seroconversión por el VIH entre pacientes infectados por VHC con hemofilia Eyster *et al.*(26) demostró que la tasa de incremento en los niveles de RNA de VHC fue 8 veces más rápida para los pacientes infectados por el VIH que para aquellos que permanecieron no infectados, esto fue demostrado posteriormente por tanaka *et al.*(27). En este estudio se buscó determinar si la persistente naturaleza de VIH afecta la diversidad genética del VHC por menos presión selectiva debido a la inmunosupresión en los pacientes coinfectados VIH/VHC, el cambio en la diversidad genética y la presión selectiva fue examinada en los genes de la envoltura de VHC (E1 and E2) de 325 genotipos 1a subclonas de 8 VIH positivo y 5 VIH negativos con 6 años de diferencia, los niveles de RNA en el grupo con VIH fue significativamente más alto que aquellos en el grupo VIH negativo, la diversidad genética del virus de hepatitis C fue significativamente más alta en el grupo VIH positivo comparado con el VIH negativo lo cual se asoció a un alta tasa de replicación del VHC y la inmunosupresión asociada a VIH.

Blackard *et al* (28) Este estudio incluyo 14 pacientes coinfectados VIH/VHC se evaluó la la diversidad de la región hipervariable 1 del plasma y del hígado de VHC demostrando que las poblaciones quasispecies circulantes no reflejan la composición de la población quasispecies intrahepáticas lo cual sugiere evidencia de compartimentalización así como los patrones de resistencia pueden variar en relación a suero/hígado.

Por lo anterior es bien documentado que la infección por VIH incrementa la diversidad genética y con ello los RAVs, entre ellos los de la región NS5A son de lo mas importantes dada su alta prevalencia, la alta capacidad replicativa del VHC con estas sustituciones y el papel primordial de los AAD con especificidad sobre la proteína no estructural NS5A.

Sede *et al* (29) evaluaron la heterogeneidad de VHC genotipo 1a intra e inter huésped a lo largo de 7 años en 21 pacientes coinfectados, los pacientes mostraron diferente

respuesta inmuno-virológicas a la terapia antiretroviral altamente efectiva. Se analizaron la secuencia del gene de la glicoproteína de la envoltura (E2). Se encontró que las quasispecies de VHC tuvieron una mayor complejidad y diversidad posterior al inicio de terapia antiretroviral.

Los RAVs NS5A son comúnmente detectados de manera basal en pacientes vírgenes a los AAD en un estudio reciente realizado en diferentes países por Zeuzem *et al* (30) en 5397 pacientes infectados por VHC con y sin coafección con VIH se les realizó secuenciación profunda usando un punto de corte clínicamente significativo de sensibilidad de 15% en pacientes infectados con genotipo 1a, al menos un RAVs fue encontrado en 13% de casos en norte américa, 14% en Europa 7% en asia-pacífico y 16% en Oceanía para genotipo 1b los RAVs basales fueron de 23% (184/802), 25% (105/416), 26% respectivamente.

En este estudio los paciente con genotipo 1a la sustituciones Q30H/R estuvo presente en 5.0% (174/3483), L31M en 4.0% (140/3483), Y93H en 2.0% (69/3483) y múltiples sustituciones fueron detectadas en 5.0% (174/3483).

En pacientes con genotipo 1b las sustituciones L31M/I/V estuvieron presentes en 7.5% (142/1887), Y93H en 16.1% (304/1887), y múltiples sustituciones fueron detectadas en 1.4% (27/1887) de casos.

En estudios de análisis de prevalencias basales a RAVs NS5A de pacientes coinfectados VIH/VHC plaza soriano *et al* (31) evaluó 78 pacientes coinfectados VIH/VHC vírgenes al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina, se secuencio la región NS5A comprendida de 447 aminoácidos usando “primers” específicos para cada genotipo y los resultados que se encontraron fueron; para VHC genotipo la doble mutación L31M+Y93H el cual resulta en alto nivel de resistencia a daclatasvir fue visto en 7% de VHC 1b y 13% de VHC genotipo 4 albergaron L31M el cual ha sido asociado con altos niveles de resistencia a daclastavir, VHC -3 albergo una sustitución en el codón 30(Q30A). de especial importancia fue que en los pacientes con genotipo 1a alguna sustitución de resistencia a daclatasvir.

Treviño *et al* (32) Realizo una evaluación similar de polimorfismo naturales asociado a resistencia a los AAD en población coinfectada con VIH/VHC 62% de NS3 y NS5B del Genotipo de VHC 1a y 30% de G1b albergaron RAVs también en dichas regiones

McCormick *et al* (33) investigo la prevalencia de RAVs por secuenciamiento de poblaciones de 3 grupos de pacientes coinfectados con VHC/VIH : (1) infección por VHC aguda(n=25), (2) pacientes vírgenes al tratamiento de VHC (n=20) y (3) pacientes crónicos experimentados al tratamiento(pIFN-RBV) quienes no consiguieron una RVS(n=34) y se comparó con 85 pacientes con infección crónica por VHC mono infectados

La variante de la región NS5A Q30H fue detectada en un solo paciente agudo confiriendo 1477 veces Resistencia a daclatasvir y las variantes en el codón 30 no difirieron marcadamente en VHC genotipo 1a entre crónicos y agudos. Las variante NS5A Y93H fue presente en 33.3% en su población crónica virgen al tratamiento del G1b fallando al tratamiento y no se detectó en la corte de VHC G1b. similar a plaza et al observaron para las secuencias de VHC Gt 1b y Gt4 las variantes M28L Y L30R confiriendo resistencia leve a daclatasvir . La variante L31M NS5A fue observada en un solo paciente con Gt1a con falla al tratamiento confiriendo 341 veces resistencia a daclatasvir. E n este estudio también se encontró RAVs en la región NS3 y ninguna en la región NS5B.

Paolucci *et al* (34) evaluo la ocurrencia natural de mutaciones e resistencia en las regiones NS5A y ns5b en 32 pacientes con genotipo 1a y 30 pacientes con genotipo1b vírgenes a los ADD. 10 de 62 pacientes (16.2%) de los pacientes fueron coinfectados con VIH todos estuvieron con terapia antiretroviral. Mutaciones de resistencia a NS5A y NS5B en pacientes coinfectados con VHC/VIH fueron encontrados en 3/10 pacientes (30%) con una diferencia no estadística VS pacientes mono infectados, las mutaciones encontradas aquí fueron M28V en NS5A, un paciente tuvo Y448H en NS5B y un paciente tuvo H58P+Y452H en NS5A y NS5B respectivamente.

Dvory-Sobol *et al* (35) Evaluó la persistencia de RAVs en pacientes que no consiguieron RVS en previos estudios clínicos de tratamiento de VHC con Ledipasvir-Sofosbuvir se determinaron los RAVs en la región NS5A con secuenciación profunda (umbral de 1%) los cuales se siguieron hasta 96 semanas en donde se encontró la persistencia de 94% de RAVs a inhibidores NS5A las sustituciones más frecuentes fueron , Los autores concluyeron que las variantes NS5A pueden persistir por más 96 lo cual recalca la alta

capacidad replicativa (Viral Fitness) de las sustituciones de aminoácidos en proteína no estructural NS5A.

Actualmente hay 3 inhibidores NS5A aprobados con documentadas RAVs que confieren diferentes grados de resistencia L31M confiere bajo a medio nivel resistencia a Daclatasvir y Ledipasvir mientras Y93H/N confiere medio a alto nivel a de resistencia a todos los 3 inhibidores NS5A aprobados en el genotipo 1a pero solo a Ledipasvir en genotipo 1b.

Recientemente la recomendaciones de las guías es realizar análisis de polimorfismos NS5A en pacientes sin tratamiento previo en quienes se considera la combinación Grazoprevir /Elbasvir para determinar la dosis y la duración del régimen (12^o 16 semanas o si Ribavirina debe ser agregado).Análisis de Resistencia basal en pacientes con infección por VHC aún no es indicado uniformemente por todas guías de manejo sin embargo con el uso extendido de los AAD se demostrara su rol en la práctica clínica y en la individualización de la mejor opción de tratamiento.(36)

Sarrazin (37) alienta el análisis basal de Resistencia para elegir el mejor régimen de AAD en pacientes con duración de tratamiento acortado o con cirrosis hepática, En el futuro se tendrá que evaluar si análisis de Resistencia basales puede ser costo efectiva con la finalidad de prevenir fallas a un tratamiento muy costoso en regiones con restricciones económicas.

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por el VHC comparte los mismos mecanismos de transmisión que el VIH por lo que la población coinfectada conforma un alto porcentaje del total de los pacientes

infectados por el VHC. La infección por el VIH acelera la evolución natural de la enfermedad hepática por el VHC, por lo que esta población tiene una indicación de tratamiento de la hepatitis C inmediata. Hasta el momento los ensayos clínicos sobre el tratamiento de los pacientes coinfectados por VIH/VHC son limitados y son mucho menos que los estudios sobre la frecuencia de RAVs que ocurren naturalmente en los pacientes coinfectados VIH/VHC sin tratamiento previo, por lo que el presente estudio permitirá conocer el comportamiento de la diversidad genética del VHC en la población coinfectada con VIH analizando la región de NS5A del genoma del virus de la hepatitis C.

Ante la introducción de AAD en los sistemas de salud de México y su introducción en los grupos prioritarios como coinfectados VIH/VHC, tener un mayor conocimiento de los RAVs en la región NS5A que ocurren naturalmente en esta población permitirá optimizar la terapia antiviral contra VHC; así como disminuir el riesgo de las fallas de un muy costoso tratamiento.

Otro aspecto no estudiado en la infección por VHC son los mecanismos de transmisión en nuestra población de pacientes con infección por VIH, es bien conocido la transmisión sexual en MSM infectados con VIH sin embargo esto no se ha determinado en nuestro contexto por lo tanto un estudio de filogenia molecular nos ayudara a determinar redes de transmisión tanto de un genotipo prevalente en nuestro país como es el tipo 1 así como uno de reciente introducción como lo es el VHC genotipo 4.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento no conocemos la prevalencia de RAVs en los pacientes infectados con VHC en México ni los mecanismos de transmisión en pacientes de VHC en pacientes coinfectados con VIH , por lo que es necesario determinar si existe una alta prevalencia de RAVs a inhibidores de NS5A en los pacientes coinfectados con VIH/VHC sin tratamiento previo que puedan comprometer el tratamiento con los nuevos agentes antivirales de acción directa disponibles en nuestra práctica clínica, así como determinar redes de transmisión entre los pacientes coinfectados con VIH/VHC.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente los aislamientos de VHC genotipos 1a, 1b y 4 determinando la prevalencia de los polimorfismos en la región genética NS5A del virus con el potencial de inducir resistencia a los inhibidores de NS5A en un grupo de pacientes coinfectados en comparación a un grupo de pacientes mono infectados. Adicionalmente se realizarán estudios filogenéticos para determinar redes de transmisión en esta población de pacientes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la mutaciones de nucleótidos más frecuentes en la región NS5A asociado con las RAVs a los inhibidores de NS5A en la población coinfectada del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Determinar la diferencia entre los genotipos 1b y 1a así como entre sus clades I Y I en cuanto a la prevalencia de las mutaciones de los nucleótidos en la región NS5A asociado con las RAVs a los inhibidores NS5A.
- Determinar la prevalencia de las mutaciones de los nucleótidos en la región NS5A asociado con las RAVs a los inhibidores NS5A en VHC genotipo 4

- Realizar una comparación de las RAVs más prevalentes en la población coinfectada VIH/VHC del INCMNSZ en cuanto a lo reportado en las bases de datos mundiales.
- Realizar un estudio de alineamientos de nucleótidos así como estudios filogenéticos para determinar si existen clusters asociados a virus con RAVs o “firmas” propias de los virus infectando la población con VIH en la ciudad de México

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Planteamiento General

Diseño: Estudio observacional transversal, estudio de procedimiento, prolectivo.

Población: Se incluirán las muestras de pacientes coinfectados por VIH/VHC que acuden a la clínica de inmunoinfectología del INNSZ. Se incluirán las muestras plasmáticas

congeladas enviadas al laboratorio de virología molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán para realización estudios moleculares virales de pacientes conocidos con infección por VHC (monoinfectados) El INCMNSZ cuenta con 167 camas, consulta externa de pacientes con hepatitis virales (clínica de hepatitis) así como consulta externa de pacientes con VIH y pacientes coinfectados con VHC. El laboratorio de virología molecular realiza ensayos moleculares en virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y VHC tanto para investigación como para asistencia clínica.

Horizonte temporal: se espera obtener los resultados de los ensayos diagnósticos, así como datos de los registros médicos de los pacientes en un periodo de 24 meses.

Criterios de selección.

Criterios de Inclusión.

Pacientes mayores de 18 años infectados por VHC con o sin tratamiento antirretroviral que nunca hayan sido tratados con agentes antivirales de acción directa con infección por VHC genotipo 1a, 1b y 4

Criterios de exclusión.

Pacientes con infección por VHC en tratamiento o ya expuestos en alguna ocasión a agentes antivirales de acción directa.

Pacientes con antecedente de infección por el VHC que se encuentren con cargas viral de VHC no detectable.

Criterios de eliminación.

Muestras con RNA de VHC no amplificable o no secuenciable

Estrategias de trabajo

De todos los pacientes infectados por el VIH que se encuentran en seguimiento en la clínica de inmunoinfectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán que actualmente tengan documentada coinfección por el VHC y que no hayan recibido tratamiento con antivirales de acción directa. Con previa aceptación del comité de ética del INCMNSZ y consentimiento informado firmado por el paciente, será extraído el plasma de los pacientes que cumplan los criterios de selección, con carga

viral previa detectable y con genotipo 1a 1b y 4. También se incluirán las muestras de pacientes mono infectados por VHC enviadas al laboratorio de virología molecular en almacenamiento congeladas.

La detección y cuantificación de carga viral de hepatitis C será realizada por medio del ensayo de amplificación en tiempo real de VHC Abbott m2000®. La determinación del genotipo se realizará con el ensayo de amplificación en tiempo real de VHC Abbott m2000® basado en la secuencia de la región NS5B (e seguirán las instrucciones del fabricante).

El ARN viral se extrajo de 1 ml de plasma utilizando tiocianato de guanidinio y se lavó con etanol como descrito por Mulder et al. (45). El gen NS5A (posiciones de nucleótidos 6057-7056 basadas en la secuencia de referencia H77) se amplificó con el kit Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen Sciences, Valencia, CA, EE. UU.), Seguido de una segunda ronda (solo en el genotipo 1b) con Amplitaq Mastermix Gold 360 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) En caso de falla en la primera ronda. Los cebadores utilizados fueron específicos de genotipo 1a, 1b y 4 (apéndice 1) Las condiciones de ciclo térmico para la primera ronda fueron 30 'a 50 ° C y 15' a 95 ° C para la transcripción inversa, seguidas de 40 ciclos a 94 ° C durante 1 ', 58 ° C durante 30 "(56 ° C para 1b subtipo), 72 ° C para 1 'y una extensión a 72 ° C para 10'. La segunda ronda tuvo las siguientes condiciones: 10 'a 95 ° C seguido de 35 ciclos a 95 ° C para 30 ", 57 ° C para 30 ", 72 ° C durante 1 'y una extensión a 72 ° C durante 7'. Los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio). La secuenciación del ciclo se realizó utilizando el colorante fluorescente Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, secuenciación Sanger de la región NS5A con un secuenciador automático ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EE. UU.). Las secuencias de nucleótidos se ensamblaron con el software Seqscape (versión 2.5, Applied Biosystems) Las secuencias de nucleótidos de HCV NS5A se enviaron a GenBank, números de acceso MT233451-MT233503 (1a), MF114237-MF114245 y MT233504-MT233518 (1b).

Polimorfismos asociados a la resistencia a NS5A, análisis filogenético y patrones de firma de aminoácidos en genotipo 1a y 1b

La búsqueda de RAVs en secuencias NS5A se realizó con el algoritmo HCV-GLUE [20] con las siguientes definiciones: los polimorfismos de categoría I tienen la evidencia más confiable: (a) nivel de resistencia in vitro ≥ 5 y encontrado al inicio del estudio o emergente del tratamiento in vivo, o (b) ambos encontrados al inicio del estudio y emergentes del tratamiento. Categoría II: nivel in vitro ≥ 50 o encontrado al inicio del estudio o emergente del tratamiento. Categoría III: nivel in vitro ≥ 5 (<http://hcv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/project/rap>). Complementamos la investigación de RAVs con una revisión adicional de la literatura. El análisis filogenético se realizó utilizando las secuencias NS5A de este estudio más otras 30 secuencias NS5A (HCV GT1a y 1b) recuperadas de la base de datos GenBank. La alineación de las secuencias se realizó con el algoritmo MUSCLE y los árboles filogenéticos se construyeron con el software MEGA (versión X) utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud y el modelo general reversible en el tiempo de sustitución de nucleótidos con distribución γ ($\alpha = 0,4$). La robustez de la rama del árbol se evaluó con la prueba de arranque (500 repeticiones) y se definió un grupo con un límite del 70%. Las secuencias de aminoácidos NS5A de HCV GT1a (clade 1 y 2) y Gt1b obtenidas en nuestro estudio fueron secuencias de consulta y se compararon con las respectivas secuencias de fondos, y se analizaron con el software VESPA para encontrar patrones de firma con un umbral mínimo del 80%.

Genotipado, amplificación y secuenciación de Sanger de HCV genotipo 4

La detección inicial de genotipo se realizó como descrito anteriormente como para genotipo 1a y 1b sin embargo se realizó una evaluación confirmatoria adicional del genotipo amplificando y secuenciando la región 5'UTR mediante el kit de secuenciación Deepchek SingleRound PCR y NS5B / 5'UTR (ABL, Luxemburgo). El segmento 5'UTR (244 pb) se evaluó con la herramienta en línea Standard Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). En aquellas muestras de VHC GT4 confirmadas para realizar subtipificación y análisis filogenético, se amplificó un segmento del gen NS5B (420 pb) y se secuenciaron con el kit de secuenciación Deepchek NS5B / 5'UTR. Además, un segmento del gen NS5A (610 pb) fue amplificado y secuenciado con la técnica de Sanger con cebadores y condiciones descritas en apéndice 1 y por Nguyen et al (46). Las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank con los siguientes números de acceso:

5'UTR, MZ131589-MZ131601; NS5A, MZ131602 - MZ131615; NS5B, MZ131616 - MZ131628.

Análisis filogenético, temporalidad molecular y evaluación de NS5A RAVs

Se construyeron árboles filogenéticos con 14 secuencias NS5A y 13 NS5B de aislamientos mexicanos y todas las secuencias de referencia de subtipos GT4 depositadas en GenBank en todo el mundo. La alineación de las secuencias se realizó con el algoritmo MUSCLE, y los árboles filogenéticos se infirieron con el método estadístico de máxima verosimilitud con un modelo general reversible en el tiempo de sustitución de nucleótidos con distribución γ ($\alpha = 0,4$) utilizando el software MEGA X. La robustez de la rama del árbol se evaluó con la prueba de arranque (1000 repeticiones), y un grupo se definió por un valor de arranque $> 70\%$ y un umbral de distancia genética $< 3\%$. Luego de confirmar que nuestras muestras eran VHC GT4 subtipo d (GT4d), en aras de estimar tiempos de divergencia, tiempo de introducción en nuestro país y ancestros geográficos, se realizó un árbol filogenético adicional con las 13 secuencias mexicanas GT4d NS5B y 119 GT4d NS5B a nivel mundial. recuperado de GenBank, que había especificado el país de origen y la fecha de muestreo. Los tiempos de divergencia se estimaron con el método RelTime con Dated Tips utilizando Mega X (47). La búsqueda de RAVs en las 14 secuencias de NS5A se realizó con el algoritmo HCV-GLUE (<http://hcv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/home>).

Análisis estadístico

Describimos nuestros resultados utilizando proporciones, medianas (con IQR) y medias (con desviaciones estándar) según se requiera. Comparamos las covariables cuantitativas utilizando la prueba t de Student no apareada (distribución normal) o las pruebas de Wilcoxon (distribución no normal), las proporciones utilizando la prueba de la χ^2 de Pearson. Seleccionamos factores descritos en la literatura como asociados con RAVs como cirrosis, genotipo, tratamiento previo con interferón-alfa pegilado y ribavirina (pegIFN-RBV), coinfección por VIH y sexo. Realizamos un análisis de regresión logística bivariado y multivariado para identificar cuáles de estos factores estaban relacionados con la presencia de RAS en nuestro grupo de estudio. En el modelo multivariado, incluimos todas las covariables que mostraron una $P \leq 0,10$ en el análisis bivariado. Consideramos una $P < 0,05$ como estadísticamente significativa. Todos los análisis se realizaron con el software R 3.5.2 (equipo central de R, 2019).

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

No se contempla realizar maniobra alguna que pueda poner en riesgo al paciente. El proyecto deberá ser aprobado por el Comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran” Se seguirán las leyes y normas tanto nacionales como internacionales para investigación clínica y aplicada en los humanos: Ley de General de Salud, artículos 20, 100, 103 y pertinentes; (Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.) Se apega plenamente a los principios éticos básicos mencionados en la declaración de Helsinki y el informe Belmont (1978) el cual refiere cuatro principios: el respeto por las personas y a su autonomía, la no maleficencia, la beneficencia y por último la justicia.”

Declaro no potenciales conflictos de intereses. La aprobación del comité de ética e investigación del Instituto nacional de ciencias médicas y nutrición salvador Zubirán fue con una enmienda del protocolo INF- 1870.

7. RESULTADOS

VHC GENOTIPO 1a y 1b

Población de estudio

Se evaluó un total de setenta y nueve pacientes, de los cuales 49 (62%) eran pacientes con VHC coinfectados por VIH y 30 (38%) eran pacientes con VHC mono infectados. En el grupo de pacientes con VHC coinfectados por VIH, GT1a predominó con el 90%

(44/49). GT1b fue el subtipo principal en el grupo de pacientes con VHC mono infectados, con el 63% (19/30). El grupo de pacientes con VHC coinfectados por VIH tenía un número significativamente mayor de varones y pacientes más jóvenes que el grupo de pacientes con VHC mono infectados (Tabla 1). Una proporción tan alta como el 98% (48/49) de los pacientes con VHC coinfectados por el VIH estaban recibiendo TAR y el 86% (42/49) tenía una carga viral indetectable. En todos los pacientes, sus recuentos de CD4 fueron > 100 células / mm³ (mediana, 467; rango, 107-1009). La proporción de pacientes en el grupo de estudio general con fibrosis hepática grave (F3) y cirrosis (F4) fue del 10% (8/79) y del 19% (15/79), respectivamente, y la proporción de estos estadios fue significativamente mayor en pacientes mono infectados con VHC (60% frente a 10%). Hubo antecedentes de tratamiento con pegIFN-RBV hasta en un 40% (12/30) de los pacientes con VHC mono infectados y solo en el 6% (3/49) de los pacientes con VHC coinfectados por VIH (Tabla 1).

Table 1. Datos demograficos y clinic de pacientes con VHC quienes sus secuencias NS5A fueron evaluadas, agrupadas acorde a infeccion por VIH

Características clínicas	HCV/HIV (n=49)	HCV-mono infectados (n=30)	<i>P</i>
Edad (años), Mediana (RIQ)	38 (31-43)	52 (42-63)	<0.001

Hombres(%)	45(92)	9(30)	<0.001
Mediana VHC			
Carga viral ,log IU/mL, (RIQ)	6.0 (5.4-6.5)	5.7 (5.3-6.2)	0.12
Estadio de fibrosis hepatica			
F0-F1 (%)	41 (84)	9(30)	<0.001
F2 (%)	3 (6)	3 (10)	0.66
F3 (%)	2 (4)	6(20)	0.04
F4 (%)	3 (6)	12(40)	<0.001
Pacientes con Tratamiento antiretroviral(%)	48 (98)	-	-
Mediana VIH			
Carga viral (RIQ), copies/mL	40 (20-424)	-	-
Mediana de cuenta de CD4 count (RIQ), cells/mm ³	457(309-606)	-	-
Numero de pacientes que han recibido tratamiento con Peg-IFN + RBV (%)	3 (6)	12 (40)	<0.001
Años transcurridos			
Desde el diagnostico de VHC , mediana (RIQ)	7 (4-10)	7 (1-10)	0.03
Genotype 1a (%)	44(90)	11 (37)	<0.001
Genotype 1b (%)	5(10)	19(63)	

HCV, Hepatitis C Virus; HIV, Human Immunodeficiency Virus; IQR, interquartile range; F0-F1, no or portal fibrosis; F2, portal fibrosis with few septa; F3, septal fibrosis; F4, cirrhosis, Peg-IFN + RBV, pegylated interferon; RBV, ribavirin

Análisis de RAS

Se analizaron setenta y nueve secuencias de NS5A; en las secuencias GT1a (n = 55), los RAVs estaban presentes en el 11% (6/55) de los pacientes, de los cuales cinco eran M28V y uno era sustitución A92T. En las secuencias de GT1b (n = 24), se encontraron RAS en el 71% (17/24), de los cuales fueron los siguientes; Y93H + F37L + Q54H (1/24),

Y93H + F37L (1/24), P58S (1/24), L31F + F37L (1/24), F37L + H / Q54H (3/24), F37L (10 / 24). De las secuencias totales analizadas, el 62% (49/79) eran de pacientes con VHC coinfectados por VIH, y solo el 16% (8/49) de estos mostraban RAVs (Tabla 2), que eran significativamente menores que los pacientes con VHC mono infectados (50% [15/30]), $P = 0,003$. En los pacientes con RAS, la mediana del grado de fibrosis fue significativamente mayor (mediana, 3; IQR, 1-4) que los pacientes sin RAVs (mediana, 1; IQR, 1-2), como se muestra en el análisis bivariado (Tabla 3). Los pacientes con antecedentes de tratamiento con pegIFN-RBV estaban presentes en el 52% (12/23) de las secuencias con RAVs, que comprendían F / L37L (8/12), L31F + F / L37L (1/12), F / L37L + H / Q54H (1/12), Y93H + F / L37L + H / Q54H (1/12) y P58S (1/12). La mediana de la carga viral del VHC de las muestras con RAVs fue significativamente menor que las muestras sin RAVs (5,46 frente a 6,03 log UI / ml, $P = 0,02$).

Table 2. Características clínicas, tratamientos y desenlaces de los pacientes infectados por VCH agrupados acorde a su nivel de resistencia a inhibidores NS5A

Paciente	edad	Sexo	Grado de fibrosis	Genotipo VHC	Carga viral VHC IU/mL	HIV status	Carga viral VIH copias/mL	Cuenta de CD4 cells/mm ³	TAR	RAV NS5A	Tratamiento o previo de VHC	Tratamiento con DAAs	RVS
Categoría de resistencia I													

INCMNSZ_7_1a_NS5A	31	M	F2	1a	152750	si	<40	223	si	M28V	no	LDV/SOF 24 wk	si
INCMNSZ_9_1a_NS5A	60	F	F4	1a	90930	no	-	-	-	M28V	no	LDV/SOF 24 wk	si
INCMNSZ_26_1a_NS5A	35	F	F4	1a	214609	no	-	-	-	M28V	no	no	-
INCMNSZ_46_1a_NS5A	40	F	F1	1a	2131710	si	<40	640	si	M28V	no	no	-
INCMNSZ_48_1a_NS5A	25	M	F0	1a	833622	si	<40	689	si	M28V	no	no	-
INCMNSZ_14_1b_NS5A Categoria de resistencia II	55	F	F4	1b	93604	si	<40	459	si	L31F+F/L37L	Peg-IFN + RBV	no	-
INCMNSZ_22_1b_NS5A	40	M	F0	1b	291664	si	<40	593	si	F/L37L	no	no	-
INCMNSZ_5_1b_NS5A	62	M	F4	1b	1428843	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN	LDV/SOF + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_6_1b_NS5A	36	F	F4	1b	254894	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_7_1b_NS5A	63	F	F4	1b	2915390	no	-	-	-	F/L37L	no	no	-
INCMNSZ_11_1b_NS5A	47	F	F3	1b	198399	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN + RBV	Simeprevir + sofosbuvir + RBV 24 wk	si
INCMNSZ_18_1b_NS5A	42	M	F1	1b	381005	si	<40	604	si	F/L37L	Peg-IFN + RBV	no	-
INCMNSZ_3_1b_NS5A	70	F	F3	1b	2073757	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_19_1b_NS5A	67	F	F1	1b	1989579	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_20_1b_NS5A	46	F	F1	1b	52352	no	-	-	-	F/L37I	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si

INCMNSZ_21_1b_NSS A	49	M	F4	1b	3417000	no	-	-	-	F/L37L	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_23_1b_NSS A	29	M	F1	1b	541629	si	<40	492	si	F/L37L+H/Q54L	no	no	-
INCMNSZ_13_1b_NSS A	64	F	F1	1b	94962	no	-	-	-	F/L37L+H/Q54H	no	no	-
INCMNSZ_16_1b_NSS A	68	F	F2	1b	2036909	no	-	-	-	F/L37L+H/Q54H	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
>INCMNSZ_10_1b_NSS A	45	F	F0	1b	131974	no	-	-	-	P58S	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
INCMNSZ_8_1b_NSSA	41	M	F4	1b	133125	no	-	-	-	Y93H+F/L37L+H/Q54H	Peg-IFN + RBV	PrOD + RBV 12 wk	si
Catergoria de resistencia III													
INCMNSZ_27_1a_NSS A	30	M	F0	1a	1188597	si	<40	555	si	A92T	no	no	-
INCMNSZ_17_1b_NSS A	62	M	F4	1b	173739	no	-	-	-	Y93H+F/L37L	no	no	-

VHC, virus hepatitis C; VIH, Virus de inmunodeficiencia humana; TAR, terapia antiretroviral; F0-F1, no o fibrosis portal; F2, fibrosis portal con pocos septos; F3, Fibrosis septal; F4, cirrosis; M, masculino; F, femenino; Peg-IFN,interferonpegylated; LDV/SOF, ledipasvir/sofosbuvir; PrOD, ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir; RBV, ribavirin; WK, semanas; RVS, Respuesta viral sostenida.

Dentro del GT1a, el clado 1 comprendía el 76% (42/55) de las secuencias y el clado 2, el 24% (13/55). Las secuencias obtenidas de pacientes con VHC coinfectados por VIH fueron principalmente del clado 1 en el 69% (34/49), y el resto fueron del clado 2 (10/49). En cuatro secuencias del clado 1 (10%), se encontró el RAS M28V, de los cuales tres

eran de pacientes con VHC coinfectados por VIH. En una secuencia del clado 2 (8%), se encontró el RAV A92T en un paciente con VHC coinfectado por VIH.

En el análisis bivariado de factores asociados con RAVs, todos los factores evaluados tuvieron significación estadística, principalmente la historia previa de tratamiento con pegIFN-RBV y el VHC GT1b (Tabla 3). En el análisis multivariado, solo este último siguió siendo un factor fuertemente asociado.

Table 3. Analisis bivariado y multivariado of factores asociados con la presencia de RAVs

	Bivariable OR (95% CI)	P	Multivariable aOR (95% CI)	P
Genero (Femenino)	4.7 (1.6 – 13.5)	0.003	2.3 (0.5 - 10.4)	0.26
Fibrosis severa or cirrosis (F3-F4)	3.7 (1.3 – 10.7)	0.003	1.5 (0.3 - 6.7)	0.57
HIV	0.2 (0.1 – 0.7)	0.01	3.5 (0.4 - 25.1)	0.21
Previo tratamiento de VHC ^a	11.9 (3.2 – 43.9)	<0.001	2.9 (0.4 - 20.8)	0.29
Genotype (1b)	19.3 (5.8 – 67.3)	<0.001	16.3 (2.7 - 97.4)	0.002

a; tratamiento con pegylated interferon + ribavirin; RAVs, variantes asociadas a resistencia ; VHC, virus de hepatitis C ; VIH, virus de inmunodeficiencia humana; OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; F3, fibrosis septal; F4, cirrosis.

Las características clínicas de todos los pacientes infectados por el VHC con secuencias con RAS se muestran en la tabla 2, así como el tratamiento y los resultados de los pacientes que recibieron tratamiento con AAD. Hasta ahora, el 52% (12/23) de los pacientes han recibido tratamiento con una combinación de AAD y todos han logrado una respuesta viral sostenida (RVS).

Análisis filogenético y patrones de firma de aminoácidos

El análisis filogenético mostró tres grupos principales que comprenden HCV-GT1a clade 1, GT1a clade 2 y GT1b. Veintinueve secuencias de GT1a del clado 1 se agruparon en un subgrupo compuesto por pacientes con VHC coinfectados por VIH. El clado 2 de GT1a tenía un pequeño subgrupo de 6 secuencias relacionadas de cinco pacientes con VHC coinfectados por VIH y una de un paciente con VHC mono infectado (Figura 1). Las secuencias de GT1b mostraron un pequeño subgrupo entre una muestra de un paciente con VHC mono infectado y un paciente con VHC coinfectado por VIH (INCMNSZ 24 1b NS5A, INCMNSZ 15 1b NS5A). El resto de secuencias se entremezclaron con

Figura 1. Árbol filogenético de HCV GT1a y GT1b de la región NS5A (~ 1000 nt). Se mostraron nodos con ≥ 70 de los valores de bootstrap. Hay tres grupos principales compuestos de la siguiente manera: GT1a clade 1, INCMNSZ_15_1a_NS5A a EU256106; GT1a clade 2, INCMNSZ_45_1a_NS5A a EU482858; GT1b, MK143444 a INCMNSZ_24_1b_NS5A. Dentro del grupo de clado 1, hay un subgrupo de secuencias de pacientes con VHC coinfectados por VIH (círculos rojos). Los nodos terminales con símbolos tienen la siguiente codificación: cuadrado, europeo; triángulos, asiáticos; rombo, americanos; Solo se mostró el código de identificación para las secuencias de pacientes con VHC mono infectados de este estudio.

VHC GENOTIPO 4

Había 14 pacientes con VHC GT4, todos ellos con infección por VIH. Sólo un paciente era del sexo femenino (INCMNSZ_10_GT4), todos los pacientes masculinos eran HSH y la paciente refirió un comportamiento sexual de alto riesgo; todos los pacientes niegan antecedentes de uso de drogas intravenosas. Su mediana de edad fue de 35 años (rango, 23-49). Desde el diagnóstico del VHC hasta el momento de la toma de muestras, transcurrieron una media de 57 semanas (rango, 1-186), y todos los pacientes no han recibido tratamiento contra el VHC. El nivel medio de alanina aminotransferasa fue de 104,6 U / L (rango, 11-344) y todos los pacientes tenían un grado F0-F1 de fibrosis hepática. Todos los pacientes estaban recibiendo terapia antirretroviral y 13/14 tenían una carga viral de ARN VIH indetectable con una mediana del recuento de CD4 de 590 células / mm³ (rango, 209-1010).

Las muestras de pacientes coinfectados por VHC / VIH tenían una carga viral media por VHC de 5.4 log UI / mL (rango, 3.9-6.8), el análisis filogenético de la región NS5A mostró que las 14 secuencias mexicanas están dentro del grupo de GT4d y conforman una subcluster con 99% de soporte de bootstrap y dentro de este, un pequeño subcluster de 6 secuencias y un par homólogo (Figura 2). La distancia genética media dentro de este grupo fue 0,009 (rango, 0-0,018).

El análisis filogenético de la región NS5B mostró los aislados mexicanos en un subgrupo significativo dentro del grupo de secuencias de referencia GT4d con el par homólogo INCMNSZ_4_GT4 e INCMNSZ_4_GT4 todavía presente. Las distancias genéticas dentro de este grupo tenían una media de 0,006 (rango, 0-0,022). Sorprendentemente, el subgrupo de aislamientos mexicanos y un aislado francés GT4d (JF964967) compartieron un ancestro común con una distancia genética media de 0.042 (rango, 0.037-0.053) (Figura 3). El análisis filogenético de solo secuencias representativas de GT4d en todo el mundo mostró nuevamente un grupo no monofilético de aislados mexicanos que comparten un ancestro común con la misma secuencia de Francia con la distancia genética más corta (media, 0.002) en comparación con las otras secuencias de 4d en todo el mundo (Figura 4). El análisis de divergencia temporal mostró una introducción reciente de HCV GT4 en nuestro medio alrededor de septiembre de 2015 (CI 95, octubre de 2002 a diciembre de 2015), y el ancestro común más reciente compartido con la fecha de aislamiento francés desde noviembre de 2004 (CI 95, noviembre de 1949- Diciembre de 2006) (Figura 4).

El análisis de NS5A RAVs mostró que tres aislamientos que albergaban T58P RAV (INCMNSZ_4_GT4, INCMNSZ_12_GT4 e INCMNSZ_14_GT4).

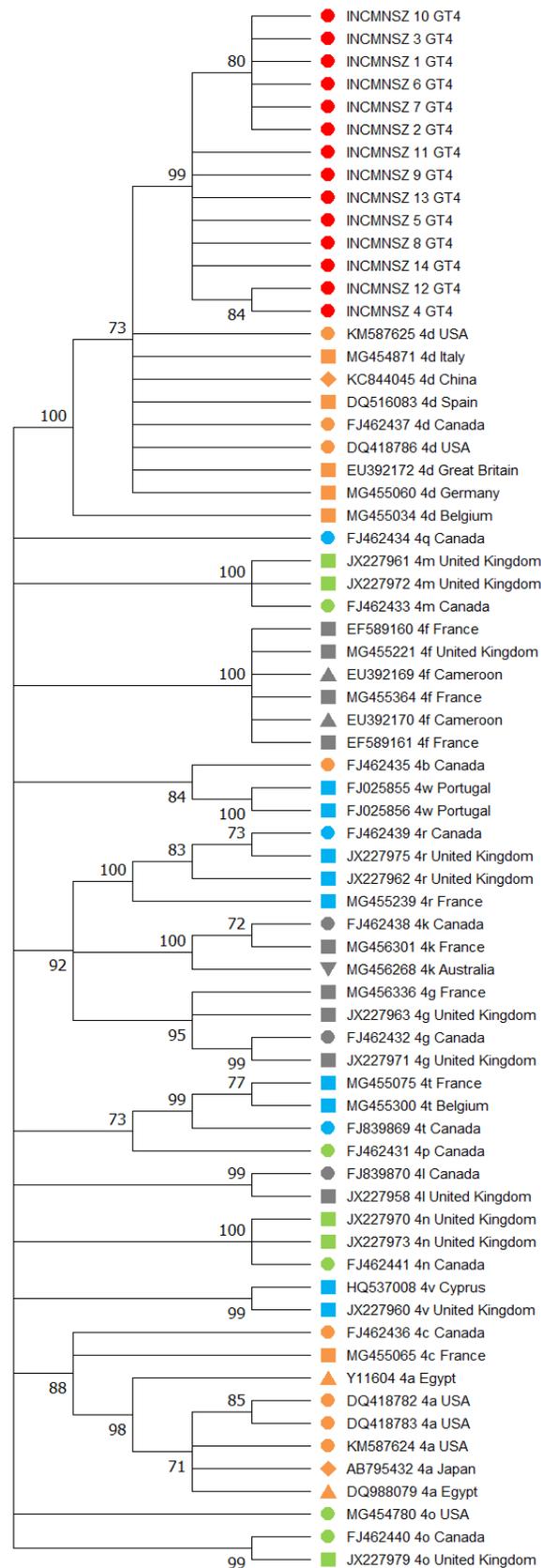


Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud de secuencias de HCV con 1000 repeticiones que muestran la siguiente codificación de subtipos y origen geográfico: rojo, secuencias mexicanas de este estudio; naranja, 4a, 4b, 4c, 4d; gris, 4f, 4g, 4h, 4k, 4l; verde, 4m, 4n, 4o, 4p; azul, 4q, 4r, 4t, 4v, 4w. Círculos, América; triángulo invertido, Australia; rombo, Asia; cuadrado, Europa; triángulo, África. Arbol filogenético de 14 secuencias GT4 NS5A de este estudio y 55 subtipos diferentes en todo el mundo, solo se muestran las ramas con un valor de arranque > 70.

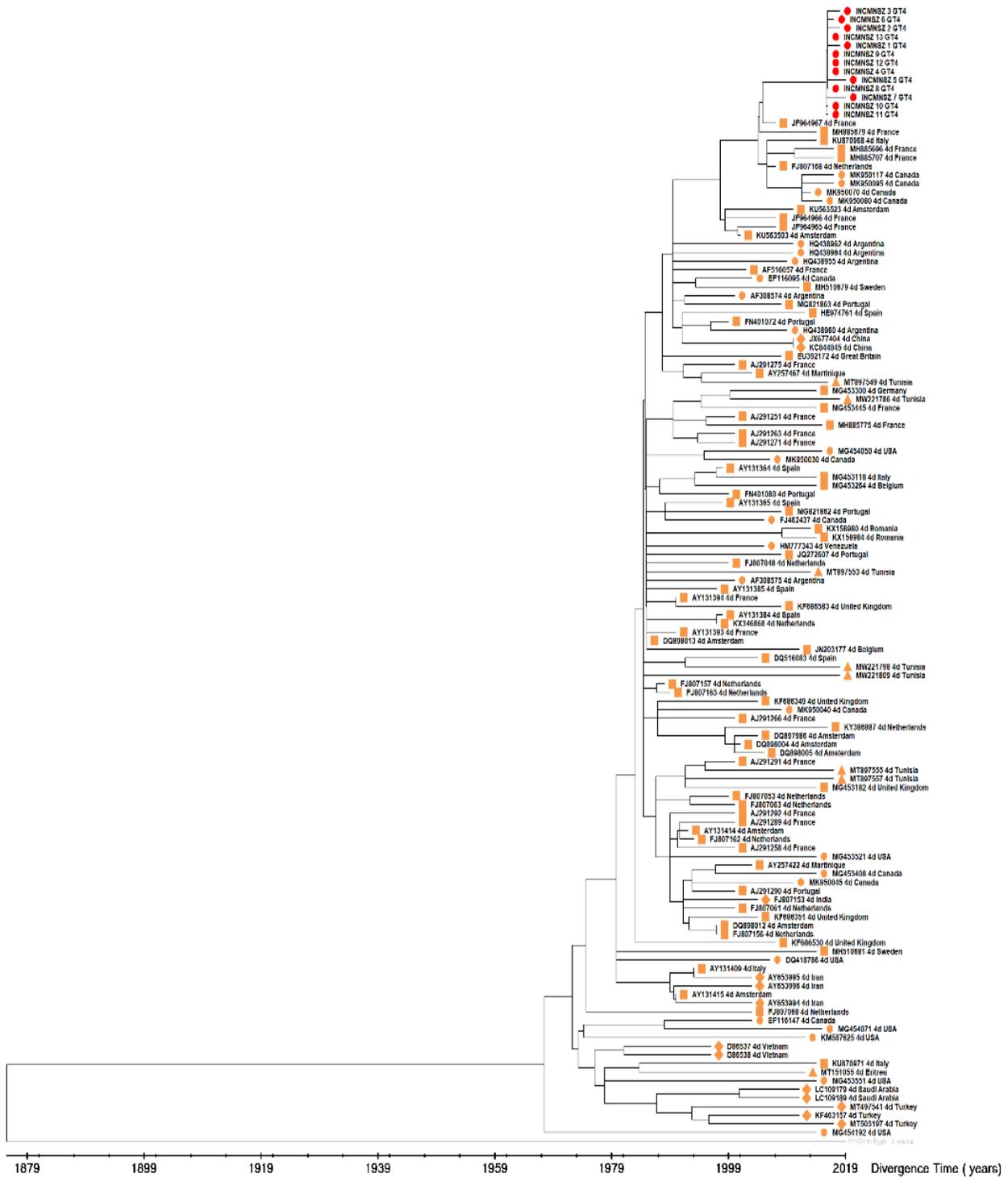


Figura 4. Árbol de máxima verosimilitud de secuencias de HCV con 1000 repeticiones que muestran la siguiente codificación de subtipos y origen geográfico: rojo, secuencias mexicanas de este estudio; naranja, 4a, 4b, 4c, 4d; gris, 4f, 4g, 4h, 4k, 4l; verde, 4m, 4n, 4o, 4p; azul, 4q, 4r, 4t, 4v, 4w. Círculos, América; triángulo invertido, Australia; rombo, Asia; cuadrado, Europa; triángulo, África. Árbol de tiempo de 13 secuencias NS5b de este estudio y 119 GT4d NS5B en todo el mundo, el grupo externo fue una secuencia GT4a egipcia.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

VHC Genotipo 1a y 1b

Este estudio mostró una frecuencia global de EAR de hasta 29% en un grupo de pacientes mexicanos con VHC GT1, que es el genotipo más frecuente en nuestro medio. Se incluyeron muestras de pacientes con varias características destacables, como coinfección por VIH y pacientes con cirrosis. Nuestro análisis multivariado que incluyó variables que se han encontrado en asociación con la presencia de RAVs mostró que HCV GT1B está fuertemente asociado con la presencia de RAVs. Los RAVs en nuestra población de estudio no parecían tener relaciones entre las muestras a pesar de que había grupos de transmisión en nuestro grupo de estudio, principalmente en el subconjunto de pacientes con VHC coinfectados por VIH con GT1a.

Nuestro estudio mostró una alta frecuencia de RAS basales mayores (categoría I), 9% en GT1a y 16% en GT1b, y hasta 54% de polimorfismos asociados con resistencia (categoría II y III). Estos resultados fueron algo similares a un estudio mundial que informó una prevalencia global de RAVs para GT1a del 13% y GT1b del 18% (48). El último estudio evaluó algunos países de América como EE.UU., Canadá y Puerto Rico, donde la prevalencia de RAVs notificada fue del 12,9% en GT1a y del 16% en GT1b (48). Estos datos contrastan con las prevalencias más altas notificadas en Argentina (1a, 23,3%; 1b, 27%) (49) y Brasil (1a, 7,3%; 1b, 31,6%) (50).

En cuanto a los RAVs específicos en el HCV GT1a, el M28V RAVs fue el más prevalente en nuestro estudio (9%). Este RAV ha mostrado una mayor prevalencia en el VHC GT1a de América del Norte (6%) en comparación con Europa (0% -4,7) (51). El M28V RAV tuvo una prevalencia al inicio del estudio de hasta el 30% en aquellos pacientes que no lograron una RVS con regímenes basados en ombitasvir (51). Además, la tasa de RVS en pacientes infectados con GT1a tratados con regímenes basados en elbasvir fue menor en aquellos con sustitución inicial de M28V (86%) que en pacientes sin RAVs (98%) (52). Sin embargo, M28V no mostró resistencia contra regímenes basados en ledipasvir, pero las sustituciones M28A / G confieren una susceptibilidad > 100 veces menor a ledipasvir (48). En nuestro estudio, el A92T RAV solo estuvo presente en un paciente; este RAV redujo la susceptibilidad a ledipasvir en los análisis fenotípicos con un aumento en el cambio de CE50 veces de 0,031 a $15,2 \pm 3,9$. No se ha encontrado A92T en los ensayos

clínicos del tratamiento con ledipasvir / sofosbuvir al inicio del tratamiento o surgido del tratamiento en muestras de pacientes con insuficiencia virológica (48,53).

Con respecto a los RAVs de HCV GT1b, tuvimos dos pacientes con Y93H RAV. Este RAV ha sido más frecuente en GT1b de la Unión Europea y países de Asia Pacífico en comparación con los países americanos (48, 53, 54). Y93H RAV solo mostró que los estudios de susceptibilidad in vitro incrementaron el cambio de CE50 veces desde 67 para elbasvir hasta > 1000 para ledipasvir . Además, este RAV al inicio del estudio ha reducido entre un 40-90% la tasa de RVS12 en los ensayos clínicos de regímenes basados en daclatasvir (55), ombitasvir (56), ledipasvir (48,53) y elbasvir (52). En los regímenes con estos AAD, se ha encontrado Y93H en más del 70% de fracaso (51). En nuestro estudio, uno de los dos pacientes con Y93H también tenía Q54H y F37L. Los ensayos in vitro de Q54H solo no aumentaron el cambio de veces; sin embargo, Q54H + Y93H mostró una susceptibilidad 10 veces menor a daclatasvir (57). F37L no aumentó la CE50 para los ensayos in vitro de daclatasvir; sin embargo, F37L + Y93H redujo 19 veces la susceptibilidad a daclatasvir y aumentó su capacidad de replicación en un 34% en comparación con Y93H solo (capacidad de replicación, 20%) (57). Tuvimos un alto porcentaje de Q54H (17%) y F37L RAV (67%), que son de categoría II. La prevalencia de estos RAVs en los estudios clínicos de pacientes japoneses con VHC GT1b al inicio del estudio fue de alrededor del 48,3% (58). La combinación concomitante de Q54H y F37L se asoció significativamente con una tasa de RVS más baja en comparación con los pacientes sin estos RAVs (80% frente a 92%, $P = 0,004$) (59). Un paciente con GT1b tenía L31F RAS. Este RAV ha mostrado una resistencia de 5 a 15 veces a daclatasvir (53), ledipasvir , ombitasvir (56) y elbasvir (58), y mejoró la capacidad de replicación un 46% más que el VHC de tipo salvaje. Además, se ha encontrado L31F / I / M / V en pacientes con fracaso virológico al inicio del estudio en un 10% y hasta en un 50% en el momento del fracaso (59). Por último, un paciente con genotipo 1b tenía P58S RAS (categoría III), que no ha demostrado in vitro aumentar el cambio de veces para daclatasvir (57) y ombitasvir (56). Sin embargo, P58S ha mostrado una función de sustitución secundaria, aumentando el cambio de veces combinado con sustituciones primarias como Y93H y L31V (56,57). Además, este RAV se ha encontrado al inicio del estudio en pacientes clasificados como respondedores nulos al tratamiento con pegIFN-RBV (60,61).

Nuestra población de estudio mostró que los pacientes infectados por VHC GT1 con VIH tenían una prevalencia de RAVs basal de aproximadamente el 10% (genotipo 1b, 17%; genotipo 1a 7%), esta prevalencia es algo similar con los ensayos clínicos seminales de AAD en población coinfectada por VIH como como ALLY-2 (17%) (62), ION-4 (18%) (63), C-WORTHY (12%) (64) y COINFECCIÓN C-EDGE (8%) (65). Además, en nuestro estudio, a pesar de las limitaciones inmunológicas en pacientes coinfectados por VIH / VHC pacientes, este grupo tuvo una menor prevalencia de RAVs que los pacientes monoinfectados (19%). Nuestro grupo de pacientes coinfectados por VIH / VHC recibían el TAR adecuado y tenían recuentos altos de CD4, lo que se ha asociado con una mayor diversidad de quasiespecies debido a la presión inmuno selectiva. A pesar de esta mayor diversidad, los estudios en estos pacientes no han mostrado una mayor prevalencia de RAVs, al menos en el gen NS3 del VHC. La baja prevalencia de RAVs en pacientes coinfectados por VIH / VHC está en concordancia con informes anteriores de pacientes de España y Polonia, que han comparado los RAS basales en pacientes coinfectados y monoinfectados. Este último grupo tuvo la mayor prevalencia, principalmente cuando estaba infectado por GT1b. Creemos que la causa principal de una menor prevalencia de RAVs en nuestros pacientes infectados por el VIH se debe a que solo teníamos cinco pacientes infectados por el VIH con GT1b. Dado que nuestro análisis multivariado solo mostró el GT1b como una variable significativa asociada con RAVS, en lugar de factores previamente descritos como fuertemente asociados, como fibrosis avanzada o cirrosis, y tratamiento previo con pegIFN-RBV.

Nuestro análisis filogenético mostró agrupaciones en los pacientes con VHC coinfectados por VIH; sin embargo, todos estos pacientes no tenían RAVs. Los pacientes con presencia de RAVs no tenían ninguna relación, lo que sugiere que la transmisión de RAVs es menos probable. Estos hallazgos han sido demostrados por un estudio filogenético de 2216 secuencias NS5A de varias bases de datos en las que la mayoría de las RAVs basales parecen haber ocurrido de novo (66). Además, una serie de casos de Argentina ha informado de la falta de conglomerados de transmisión de RAVs (49). Otro estudio reciente no encontró grupos de transmisión de RAVs; por el contrario, este estudio informó que la selección de virus con RAVs se asoció con la progresión de la fibrosis hepática. Hay dos informes de grupos de transmisión de VHC NS5A M28V RAV, uno en 28 pacientes y el otro en sólo 5 hombres coinfectados por el VIH que tuvieron relaciones sexuales con hombres.

Nuestra investigación mostró que dentro del GT1a, el clado 1 comprendía una proporción mayor que el clado 2; estos datos están en concordancia con la investigación de De Luca et al., en la que el clado 1a predominó en países no europeos (principalmente secuencias de EE. UU.) en comparación con los europeos (75,7% frente a 49,3%; $P < 0,001$) (67). Además, nuestros hallazgos mostraron una mayor prevalencia de RAS en las secuencias del clado 1, lo que contrasta con un estudio croata donde el clado 1 tenía sólo el 4,3% de NS5A RAVs y las secuencias del clado 2 hasta el 10,7% (68). Encontramos en el clado 1 de GT1a dos patrones de firma, uno con el aminoácido aspartato (codón 137) y el otro con alanina (codón 181). El clado 2 de GT1a solo tenía uno con aspartato en el codón 171. Las firmas en ambos clados se encontraron en el dominio 1 de NS5A, y no hay datos sobre una función específica de estas posiciones de aminoácidos en la proteína NS5A.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. El tamaño de la muestra del estudio fue pequeño, el número de RAVs de categoría I fue bajo y el subgrupo de pacientes (por ejemplo, pacientes con cirrosis), lo que podría limitar la validez externa de nuestros resultados y sacar conclusiones definitivas. Sin embargo, incluimos pacientes de diversas características y de varias regiones mexicanas que remitieron muestras a nuestro laboratorio especializado, obteniendo información desconocida antes en nuestro medio. Nuestra investigación sólo realizó secuenciación de poblaciones (15-20% de detección de cuasiespecies), y es posible que se hayan pasado por alto variantes menores del VHC, aunque las poblaciones virales entre 15-20% se han considerado de relevancia clínica. No disponemos de la información completa de respuesta virológica en 11 casos con RAVs.

En conclusión, la presencia de RAVs en nuestros pacientes infectados por el VHC tuvo una mayor prevalencia en GT1b sin una relación con el tratamiento previo con pegIFN-RBV, la gravedad de la enfermedad hepática y la coinfección por VIH, a pesar de que la transmisión entre pacientes con VHC coinfectados por VIH fue sugerida por estudios filogenéticos. análisis. El tipo de RAVs en nuestra población refuerza la recomendación de las últimas guías sobre el cribado de RAVs basales, según los AAD elegidos como terapia inicial.

VHC Genotipo 4

Este estudio molecular muestra la reciente introducción de HCV GT4d en la Ciudad de México y una red de transmisión sexual entre pacientes infectados por el VIH con una fuente probablemente transcontinental.

Recientemente, en la Ciudad de México, se demostraron grupos de transmisión de VHC GT1a entre pacientes infectados por el VIH (sección previa). Sin embargo, nunca se ha informado sobre GT4d. Desde 2001, en los primeros brotes documentados de VHC GT4d entre HSH pacientes infectados por el VIH en Francia (69), este subtipo de VHC se ha concentrado en esta población y se ha extendido aún más en Europa (11,12). Un estudio filogenético reciente ha demostrado las conexiones entre dos países europeos y un amplio intercambio desde 2003 hasta hoy día (70). Los aislamientos mexicanos mostraron una fuerte relación genética con el aislado francés HEPaIG1223 (JF964967) recolectado en 2006-2007 de un estudio de pacientes HSH infectados por el VIH (71). En este informe, hasta el 75% informó que se buscaron parejas sexuales casuales en línea y el 79% en lugares de sexo, lo que propagaría la infección por el VHC a nivel internacional, como se demuestra en un informe de Canadá. Este último mostró que los aislados GT4d de HSH pacientes VIH positivos y VIH negativos tenían una relación más estrecha con los aislados de varios países europeos, incluidos los aislados del estudio HEPaIG (72). La aparición de HCV GT4 ya ha sido documentada en América Latina en un informe de Argentina en pacientes coinfectados por VIH / VHC. Sin embargo, no pudo demostrar los clústeres de transmisión (14).

Los RAVs NS5A, que limitarían la eficacia de los antivirales de acción directa (AAD), se transmiten sexualmente en pacientes HSH infectados por el VIH con GT1a (44). Encontramos el RAV T58P en aislados estrechamente relacionados. Este RAS se ha encontrado tanto al inicio como en el fracaso en las infecciones por GT4d tratadas con ombitasvir más paritaprevir / ritonavir (73).

En conclusión, el VHC de transmisión sexual en la población de HSH con y sin infección por el VIH, incluso la transmisión heterosexual como se informó en la paciente infectada por el VIH en este estudio es un problema de salud pública en la actualidad a pesar del uso extensivo de AAD; Nuestros datos sugieren que esta población requiere medidas de prevención más efectivas y una vigilancia epidemiológica y molecular continua para detectar la transmisión por redes sexuales y detener la propagación del VHC.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1 Platt L, Easterbrook P, Gower E, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis.

Lancet Infect Dis 2016; 16:797–808

2 Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus co-infected patients. The Multivirc Group. Hepatology 1999; 30:1054–8.

3 Graham CS, Baden LR, Yu E, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2001; 33:562–9.

4 Konerman MA, Mehta SH, Sutcliffe CG, et al. Fibrosis progression in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting adults: prospective analysis of 435 liver biopsy pairs. Hepatology 2014; **59**: 767–75.

5 Lo Re V, 3rd, Kallan MJ, Tate JP, et al. Hepatic decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: a cohort study. Annals of internal medicine **2014**; 160(6): 369-79.

6 Marina B. Klein, Keri N. Althoff, Yuezhou Jing, Risk of endstage liver disease in HIV-viral hepatitis co-infected persons in North America from the early to modern antiretroviral therapy eras Clin Infect Dis. first published online August 9, 2016.

7 Del Bello D, Nagy FI, Hand J, et al. Direct-acting antiviral-based therapy for chronic hepatitis C virus in HIV-infected patients. Curr Opin HIV/AIDS 2015; 10:337–47.

8 Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2017 Mar;2(3):161-176

9 Kamal S, and Nasser I. Hepatitis C genotype 4: what we know and what we don't yet know. Hepatology 2008;47:

- 10 Zayed RA, Omran D, Zayed AA, Elmessery LO. Determinants of Infection Outcome in HCV-Genotype 4. *Viral Immunol.* 2017 Oct;30(8):560-567
1371–1383.
- 11 Liselotte van Asten, Inge Verhaest, Saida Lamzira, Et al ; Spread of Hepatitis C Virus among European Injection Drug Users Infected with HIV: A Phylogenetic Analysis, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 189, Issue 2, 15 January 2004, Pages 292–302, <https://doi.org/10.1086/380821>
- 12 M. Vogel, T. van de Laar, B. Kupfer, H.-J. Stellbrink, et al., Phylogenetic analysis of acute hepatitis C virus genotype 4 infections among human immunodeficiency virus-positive men who have sex with men in Germany, *Liver Int.* 30 (2010) 1169–1172.
- 13 Lyra AC, Ramrakhiani S, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Infection with hepatitis C virus genotype 4 in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:68-71.
- 14 Bolcic F, Jones LR, Laufer N, Quarleri J. Molecular characterization of hepatitis C virus genotype 4 sequences in HIV-coinfected patients from Argentina. *J. Med. Virol.* 83(6), 935–940 (2011).
- 15 Blackard JT, Ma G, Sengupta S, et al. Evidence of distinct populations of hepatitis C virus in the liver and plasma of patients co-infected with HIV and HCV. *J Med Virol.* 2014;86:1332–1341
- 16 Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. *Gastroenterology* 2016; 51:70–86.
- 17 Lontok E, Harrington P, Howe A, et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: state-of-the-art summary. *Hepatology* 2015;62:1623–1632.
- 18 Wyles DL, Ruane PJ, Sulkowski MS, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV inpatients coinfecting with HIV-1. *N Engl J Med* 2015; 373:714–25.
- 19 Naggie S, Cooper C, Saag M, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for HCV in patients coinfecting with HIV-1. *N Engl J Med* 2015; 373:705–13.
- 20 Osinusi A, Townsend K, Kohli A, et al. Virologic response following combined ledipasvir and sofosbuvir administration in patients with HCV genotype 1 and HIV co-infection. *JAMA* 2015; 313:1232–9.
- 21 Sulkowski M, Hezode C, Gerstoft J, et al. Efficacy and safety of 8 weeks versus 12 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or

without ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 mono-infection and HIV/hepatitis C virus co-infection (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet* 2015; 385:1087–97.

22 Rockstroh JK, Nelson M, Katlama C, et al. Efficacy and safety of grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) in patients with hepatitis C virus and HIV co-infection (C-EDGE CO-INFECTION): a non-randomised, open-label trial. *Lancet HIV* 2015; 2:e319–27

23 Sulkowski MS, Eron JJ, Wyles D, et al. Ombitasvir, paritaprevir co-dosed with ritonavir, dasabuvir, and ribavirin for hepatitis C in patients co-infected with HIV-1: a randomized trial. *JAMA* 2015; 313:1223–31.

24 Wyles D et al. Sofosbuvir/velpatasvir fixed dose combination for 12 weeks in patients co-infected with HCV and HIV-1: the Phase 3 ASTRAL-5 study. International Liver Congress, Barcelona, abstract PS104, 2016.

25 Chen JY, Feeney ER, Chung RT. HCV and HIV co-infection: mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;

26 Eyster, M. E. *et al.* Increasing hepatitis C virus RNA levels in hemophiliacs: relationship to human immunodeficiency virus infection and liver disease. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Blood* 84, 1020–1023 (1994)

27 Tanaka Y, Hanada K, Hanabusa H, et al. 2007. Increasing genetic diversity of hepatitis C virus in haemophiliacs with human immunodeficiency virus coinfection. *J Gen Virol* 88:2513–2519

28 Blackard JT, Ma G, Sengupta S, et al. Evidence of distinct populations of hepatitis C virus in the liver and plasma of patients co-infected with HIV and HCV. *J Med Virol*. 2014;86:1332–1341

29 Sede, M., Jones, L.R., Moretti, F., Laufer, N., Quarleri, J., 2014a. Inter and intra-host variability of hepatitis C virus genotype 1a hypervariable envelope coding domains followed for a 4-11 year of human immunodeficiency virus coinfection and highly active antiretroviral therapy. *Virology* 471–473, 19–28

30 Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, et al. Prevalence of pretreatment NS5A resistance associated variants in genotype 1 patients across different regions using deep sequencing and effect on treatment outcome with LDV/SOF (abstr). *Hepatology* 2015;62(suppl 1):254A.

31 Plaza Z, Soriano V, Vispo E, et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther* 2012; 17: 921-6.

32 Trevino A, De Mendoza C, Parra P, et al. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV coinfecting patients. *Antiviral Ther.* 2011;16:413–6

33 McCormick AL, Moynihan L, Macartney MJ, Garcia-Diaz A, Smith C, Johnson MA, et al. Baseline

drug resistance mutations are detectable in HCV genes NS3 and NS5A but not NS5B in acute and

chronic HIV-coinfecting patients. *Antivir Ther.* 2015;20(3):361-3.

34 Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients

35 Dvory-Sobol H, Wyles D, Ouyang W, et al. Long-term persistence of HCV NS5A variants after treatment with NS5A inhibitor ledipasvir. *J Hepatol* 2015;62:S221-S221.

36 AASLD-IDSA. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. <http://www.hcvguidelines.org>

37 C. Sarrazin, “The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice,” *Journal of Hepatology*, vol. 64, no. 2, pp. 486–504, 2016

38 Khudyakov Y. Molecular surveillance of hepatitis C. *Antivir Ther.* 2012;17(7 Pt B):1465-70

39 Rossi, L.M., Escobar-Gutierrez, A., Rahal, P., 2015. Advanced molecular surveillance of hepatitis C virus. *Viruses* 7, 1153–1188.

40 Van Asten L, Verhaestl, Lamzira S, et al. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis, *J Infect Dis*, 2004, vol. 189 (pg. 292-302)

41 Aho-Glélé, L., Giraudon, H., Astruc, et al. (2016). Investigation of a Case of Genotype 5a Hepatitis C Virus Transmission in a French Hemodialysis Unit Using Epidemiologic Data and Deep Sequencing. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 37(2), 134-139. doi:10.1017/ice.2015.263

- 42 Campo, D.S., Xia, G.-L., Dimitrova, et al. 2015. Accurate genetic detection of hepatitis C virus transmissions in outbreak settings. *J. Infect. Dis.* [Internet], jiv542 <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv542>
- 43 Andrea D. Olmstead; Digging Deeper Into Hepatitis C Virus Outbreaks, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 213, Issue 6, 15 March 2016, Pages 880–882
- 44 Popping S, Verwijs R, Cuypers L, et al; Dutch Acute HCV in HIV Study Investigators. Transmission of NS5A-Inhibitor Resistance-Associated Substitutions Among Men Who Have Sex With Men Recently Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1a. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 5;71(8):e215-e217
- 45 Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, Kwok S. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol.* 1994 Feb;32(2):292-300
- 46 Nguyen T, Akhavan S, Caby F, et al. Net emergence of substitutions at position 28 in NS5A of hepatitis C virus genotype 4 in patients failing direct-acting antivirals detected by next-generation sequencing. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Jan;53(1):80-83
- 47 Miura S, Tamura K, Tao Q, Huuki LA, Kosakovsky Pond SL, Priest J, Deng J, Kumar S. A new method for inferring timetrees from temporally sampled molecular sequences. *PLoS Comput Biol.* 2020 Jan 17;16(1):e1007046
- 48 Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, et al. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J Hepatol.* 2017 May;66(5):910-918
- 49 Martínez AP, García G, Ridruejo E, et al. Hepatitis C virus genotype 1 infection: Prevalence of NS5A and NS5B resistance-associated substitutions in naïve patients from Argentina. *J Med Virol.* 2019;91(11):1970-1978
- 50 Costa VD, Brandão-Mello CE, Nunes EP, et al. Treatment of chronic HCV infection with DAAs in Rio de Janeiro/Brazil: SVR rates and baseline resistance analyses in NS5A and NS5B genes. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216327
- 51 Dietz J, Susser S, Vermehren J, et al; European HCV Resistance Study Group. Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology.* 2018 Mar;154(4):976-988.e4

- 52 Komatsu TE, Boyd S, Sherwat A, Tracy L, Naeger LK, O'Rear JJ, Harrington PR. Regulatory Analysis of Effects of Hepatitis C Virus NS5A Polymorphisms on Efficacy of Elbasvir and Grazoprevir. *Gastroenterology*. 2017 Feb;152(3):586-597
- 53 Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, et al. Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir. *Gastroenterology*. 2016 Sep;151(3):501-512.e1
- 54 Krishnan P, Tripathi R, Schnell G, et al. Resistance analysis of baseline and treatment-emergent variants in hepatitis C virus genotype 1 in the AVIATOR study with paritaprevir-ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5445-54
- 55 Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, et al. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*. 2014 Jun;59(6):2083-91
- 56 Krishnan P, Schnell G, Tripathi R, et al. Analysis of Hepatitis C Virus Genotype 1b Resistance Variants in Japanese Patients Treated with Paritaprevir-Ritonavir and Ombitasvir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec 7;60(2):1106-13
- 57 Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):3641-50
- 58 Liu R, Curry S, McMonagle P, et al. Susceptibilities of genotype 1a, 1b, and 3 hepatitis C virus variants to the NS5A inhibitor elbasvir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Nov;59(11):6922-9
- 59 Mawatari S, Oda K, Tabu K, et al. New resistance-associated substitutions and failure of dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir. *J Gastroenterol*. 2017 Jul;52(7):855-867
- 60 Lawitz E, Gane E, Pearlman B, et al. Efficacy and safety of 12 weeks versus 18 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin for hepatitis C virus genotype 1 infection in previously untreated patients with cirrhosis and patients with previous null response with or without cirrhosis (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet*. 2015 Mar 21;385(9973):1075-86
- 61 Lawitz E, Makara M, Akarca US, et al. Efficacy and Safety of Ombitasvir, Paritaprevir, and Ritonavir in an Open-Label Study of Patients With Genotype 1b Chronic

Hepatitis C Virus Infection With and Without Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(4):971-80.e1

62 Wyles DL, Ruane PJ, Sulkowski MS, et al; ALLY-2 Investigators. Daclatasvir plus Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *N Engl J Med*. 2015 Aug 20;373(8):714-25

63 Naggie S, Cooper C, Saag M, Workowski K, Ruane P, Towner WJ, Marks K, Luetkemeyer A, Baden RP, Sax PE, et al; ION-4 Investigators. Ledipasvir and Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *N Engl J Med*. 2015 Aug 20; 373(8):705-13.

64 Sulkowski M, Hezode C, Gerstoft J, et al. Efficacy and safety of 8 weeks versus 12 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 mono-infection and HIV/hepatitis C virus co-infection (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet*. 2015 Mar 21;385(9973):1087-97

65 Rockstroh JK, Nelson M, Katlama C, et al. Efficacy and safety of grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) in patients with hepatitis C virus and HIV co-infection (C-EDGE CO-INFECTION): a non-randomised, open-label trial. *Lancet HIV*. 2015 Aug;2(8):e319-27

66 Patiño-Galindo JÁ, Salvatierra K, González-Candelas F, López-Labrador FX. Comprehensive Screening for Naturally Occurring Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antivirals in the NS3, NS5A, and NS5B Genes in Worldwide Isolates of Viral Genotypes 1 to 6. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Mar 25;60(4):2402-16

67 De Luca A, Di Giambenedetto S, Lo Presti A, et al. Two Distinct Hepatitis C Virus Genotype 1a Clades Have Different Geographical Distribution and Association With Natural Resistance to NS3 Protease Inhibitors. *Open Forum Infect Dis*. 2015 Mar 31;2(2):ofv043

68 Simicic P, Grgic I, Santak M, Vince A, Lepej SZ. Frequency of baseline NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with genotype 1 of hepatitis C virus in Croatia. *Microb Pathog*. 2019 Nov;136:103694

69 Serpaggi J, Chaix ML, Batisse D, et al. Sexually transmitted acute infection with a clustered genotype 4 hepatitis C virus in HIV-1-infected men and inefficacy of early antiviral therapy. *AIDS*. 2006 Jan 9;20(2):233-40

70 Visseaux B, Hué S, Le Hingrat Q, et al. Phylogenetic investigation of HCV-4d epidemic in Paris MSM HIV population reveals a still active outbreak and a strong link to the Netherlands. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Jun;26(6):785.e1-785.e4

71 Larsen C, Chaix ML, Le Strat Y, et al, Delarocque-Astagneau E; steering committee of the HEPAIG study. Gaining greater insight into HCV emergence in HIV-infected men who have sex with men: the HEPAIG Study. *PLoS One.* 2011;6(12):e29322

72 Murphy DG, Dion R, Simard M, Vachon ML, Martel-Laferrrière V, Serhir B, Longtin J. Molecular surveillance of hepatitis C virus genotypes identifies the emergence of a genotype 4d lineage among men in Quebec, 2001-2017. *Can Commun Dis Rep.* 2019 Sep 5;45(9):230-237

73 Schnell G, Tripathi R, Beyer J, et al. Hepatitis C virus genotype 4 resistance and subtype demographic characterization of patients treated with ombitasvir plus paritaprevir/ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov;59(11):6807-15

10. APENDICE 1

Table 1: Genotypic specific oligonucleotides used for PCR amplification of HCV NS5A domain 1

HCV genotype/ subtype	Primer name	5'-3' nucleotide sequence	Position based on H77 locus	Primer T _m
1a	RT PCR: Out forward 1a Out reverse 1a	5' <u>GTTGGCCCCGGGCGAGG</u> 3' 5' <u>CGCCCATCTCCTGCCTCCA</u> 3'	6057-6072 7038-7056	58°C
	Nested PCR: In forward 1a In reverse 1a	5' <u>TCCCCCACGCACTAYGTG</u> 3' 5' <u>GTGCAAGTTGCCTTGAGAG</u> 3'	6129-6146 6970-6988	58°C
1b	RT PCR: Out forward 1b Out reverse 1b	5' <u>TGGATGAACCGGCTGATAG</u> 3' 5' <u>CCACAGGAGRTTGGCCTC</u> 3'	6084-6102 7023-7040	57°C
	Nested PCR: In forward 1b In reverse 1b	5' <u>TCCCCCACGCACTAYGTG</u> 3' 5' <u>CTRGCYGARGAGCTGGCC</u> 3'	6129-6146 6935-6952	57°C
4	RT PCR: Out forward 4 Out reverse 4	5' GATCATGAGYGGCGAG3' 5' GAYGGRTCTGTCARCATGG3'	5942-5957 6859-6877	55°C

NS5A (1–	1	F: G1_6075	GGR GCH GTG CAR TGG ATG AAC CG
142)		R: G1_6685	ACC TGG CAY GGG CAT TTN ASR TTG TC
	3	Either protocol for genotype 1 or protocol for genotype 4 virus	
(1–143)	<u>4</u>	F: G4_6069	GGY GAR GGG GCN GTG CAG TGG ATG
		R: G4_6688	GGN ACC TGG CAG GGG CAY TTG