





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

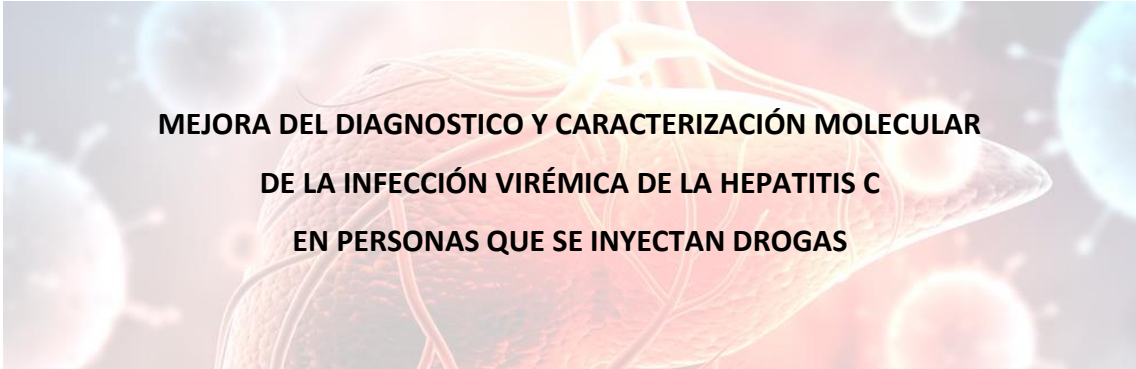
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

The background of the title section is a semi-transparent image showing a human liver in the center, with several glowing virus particles (resembling hepatitis C virus) scattered around it. The overall color palette is warm, with shades of orange, red, and yellow.

**MEJORA DEL DIAGNOSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE LA INFECCIÓN VIRÉMICA DE LA HEPATITIS C
EN PERSONAS QUE SE INYECTAN DROGAS**

Memoria presentada por Adrián Antuori Torres para optar al
grado de Doctor en Farmacia por la Universitat Autònoma de Barcelona

Vº Bº de las directoras de la Tesis

Dra. Elisa Martró Català

Dra. Verónica Saludes Montoro

Badalona, 2022

Als meus pares, Juan i Margarita

A Georgina

“La paciencia y la perseverancia tienen un efecto mágico ante el que las dificultades desaparecen y los obstáculos se desvanecen”

John Quincy Adams

Sexto presidente de los Estados Unidos

1767-1848

“La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad “

Julio Verne

Escritor francés

1864-1936

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN	17
ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA LA TESIS.....	27
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. El virus de la hepatitis C.....	31
1.1.1. Descubrimiento y origen.....	31
1.1.2. Clasificación taxonómica, estructura y organización genómica del VHC.....	32
1.1.3. Variabilidad genética del VHC y distribución en cuasiespecies	34
1.1.4. Estudio de la variabilidad genética	37
1.1.5. Filogenias moleculares.....	42
1.1.6. <i>Clustering</i> filogenético	45
1.1.7. Vías de transmisión del VHC	48
1.1.8. Prevalencia y distribución de la infección por el VHC	51
1.1.9. Distribución de los genotipos del VHC.....	54
1.2. La hepatitis C.....	56
1.2.1. Historia natural de la hepatitis C.....	56
1.2.2. Situación epidemiológica de la hepatitis C y estrategias de eliminación como problema de salud pública	59
1.2.3. Impacto de la COVID-19 en la eliminación de la hepatitis C.....	66
1.3. Diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C.....	67
1.3.1. Diagnóstico serológico y virológico de la hepatitis C.....	67
1.3.2. Diagnóstico de la infección aguda de la hepatitis C.....	71
1.3.3. Tratamiento farmacológico de la hepatitis C.....	72
1.3.4. Genotipado del VHC.....	76
1.3.5. Muestras alternativas para el diagnóstico del VHC y <i>point-of-care</i> testing (PoCT)	81

1.3.6. Estrategias de cribado de la hepatitis C	86
1.3.7. Modelos de atención de la hepatitis C.....	90
1.4. Hepatitis C en PQID.....	93
1.4.1. Situación epidemiológica de las drogas en Europa y España.....	93
1.4.2. Prevalencia e incidencia de la hepatitis C en PQID	95
1.4.3. Reducción de daños y prevención de la hepatitis C en PQID.....	97
1.4.4. Mejora del diagnóstico, acceso al sistema sanitario y tratamiento de la Hepatitis C en PQID 101	
2. OBJETIVOS	111
2.1. Justificación de la unidad temática de la Tesis Doctoral	111
2.2. Objetivos planteados	116
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
3.1. Validación de nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD	121
3.1.1. Validación una nueva técnica de detección del RNA-VHC en vida real en muestras mínimamente invasivas de sangre capilar en PQID que acuden a CRD de Cataluña (Artículo I)	125
3.1.2. Evaluación de la utilidad de una estrategia alternativa de cribado y confirmación diagnóstica en un solo paso a partir de la detección del RNA-VHC en DBS (Artículo I).....	131
3.1.3. Evaluación del PoCT Xpert® HCV VL Fingerstick para el cribado y diagnóstico de la infección virémica en PQID que acuden a CRD en Cataluña (Artículo II)	134
3.2. Caracterización de la epidemia de infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña.....	151
3.2.1. Estimación de la prevalencia por VHC en la población de estudio (Artículo I)	151
3.2.2. Validación del uso de las muestras de DBS para la estimación de la diversidad genética del VHC (Artículo III).	158
3.2.3. Determinación de los genotipos del VHC circulantes en la población de estudio (Artículo III) 163	
3.2.4. Estimación de la proporción de infecciones agudas por VHC en la población de estudio a partir de los datos de NGS (Artículo III)	168
3.2.5. Identificación de <i>clusters</i> de transmisión del VHC en la población de estudio.....	174

3.2.6. Identificación de los determinantes de infección aguda y de los <i>clusters</i> de transmisión en la población de estudio (Artículo III).....	179
4. CONCLUSIONES	187
5. BIBLIOGRAFIA	193
6. ARTÍCULOS.....	227
Artículo I	227
Artículo II	239
Artículo III	251

AGRADECIMIENTOS

Gràcies!

En primer lloc a l'Elisa i la Vero, el meu "pack" de directores. I es que a les dos us he d'agrair tot això. Moltes gràcies per ensenyar-me aquest món, per fer de mi una persona més crítica, més curiosa i amb més criteri. El que he après no té preu, i en aquest món on les coses succeeixen tant ràpid vosaltres m'heu sabut ensenyar amb la calma i rigorositat que es mereix aquesta formació, malgrat no sempre ha estat fàcil.

Elisa, moltes gràcies per acceptar-me i per la teva paciència durant aquests anys. Sóc plenament conscient que tenir de doctorant a un resident requereix un extra d'organització. Espero que hagi valgut la pena l'esforç, per la meva part tornaria a prendre aquesta decisió sense cap dubte, he tingut moltíssima sort de formar part del teu grup.

Vero, he aprendido muchísimo de ti. Eres una investigadora increíble y he tenido la suerte de andar los primeros pasos en el laboratorio contigo. Creo que, a pesar de mi torpeza, he acabado pipeteando bien... aunque la caligrafía sigue siendo mi asignatura pendiente! Bromas aparte, hay pocas personas tan íntegras como tú, y eso es lo más importante que me llevo de ti. Muchas gracias por tus consejos cuando los he necesitado y tu manera de relativizar. A partir de ahora hago mío el "es lo que hay!".

Al Dr. Ausina i la Dra. Lurdes Matas, gràcies per donar-me aquesta oportunitat i deixar-me fer les coses una mica diferents.

Als meus companys de laboratori. De tots he après algo, tant en lo professional com el lo personal. Especialment a la Sònia, pels teus riures i el teu suport. Montse, per ser un referent i pels teus consells plens d'experiència i sempre útils. Cristina, com dius tu, estàvem destinats a fer coses grans... i per a mi la rotació a Respi/BK ho va ser. A l'Alicia, la meva companya de despatx, pels bons moments i la teva comprensió. A l'Andrea i el Jonathan, per la vostra amistat i els moments gourmet! I a la Nona, la meva estança a l'hospital no hagués estat el mateix sense tu, ja ho saps. Gràcies per la teva amistat, sempre em tindràs pel que necessitis.

A la Dra. Rosa Morillas, per deixar-me veure la feina essencial que fa cada dia amb els malalts a la consulta d'hepatologia.

A tots els professionals dels centres de reduccions de danys, CEEISCAT i Agència de Salut Pública de Catalunya implicats en la recerca duta a terme durant els estudis que formen part d'aquesta tesi, i per la feina tant necessària que realitzeu cada dia al servei de la societat.

A nes meus amics, Miguel Àngel, Marc, Albert, Xumeu i Santi. Crec que mai us he explicat res des meu treball, i això m'encanta. Sou tots una part important de sa meua vida, així que gràcies.

A totes ses persones que han passat per sa meua vida i m'han marcat profundament. Malgrat no estigueu, gràcies de tot cor.

A mis suegros, José y Gertrudis. Nunca olvidaré lo atentos que estabais la primera vez que os expliqué en qué consistía mi tesis. Gracias por hacerme sentir como en casa.

A nes mues pares, Juan i Margarita. Per donar-m'ho tot. Com sóc i on estic és gràcies a valtrus. Es valors que m'heu ensenyat fan que estigui orgullós de qui sóc, esper que valtrus també ho estiguen. Segurament un fill no és sempre tot lo agraït que hauria, per això aprofito per donar-vos ses gràcies aquí. Gràcis pes vostres consells, sa vostra paciència, i es vostre amor.

A nes meus germans, Yan i Cristian. Gràcies per protegir-me, sempre us heu sentit molt orgullosos des vostre germà petit, jo també ho estic moltíssim de valtrus. A na Glòria i n'Arya, us sento com si sempre haguéssiu format part de sa meua família, el més important. A nen Juan Miguel, no em podria haver tocat un padrí millor, moltes gràcies.

A mi preciosa, Georgina. He reescrito este párrafo muchas veces, y siempre me parece insuficiente. Está tesis es medio tuya, y es que la has sufrido casi tanto como yo. Gracias por tu apoyo, y por esa manera tan incondicional y ciega que tienes de creer en mí. Gracias por soportarme cada día, por quererme como soy y por estar siempre. Te quiero.

ABREVIATURAS

AAD	Antivirales de acción directa
Ag Core	Antígeno core del virus de la hepatitis C
anti-VHC	Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C
AOR	Adjusted odds ratio
CRD	Centros de reducción de daños
DBS	Dried blood spots
DE	Desviación estándar
EASL	European Association for the Study of the Liver
EIAs	Enzyme immunoassays
ES	Entropía de Shannon
IC	Intervalo de confianza
LID	Límite inferior de detección
OMS	Organización Mundial de la Salud
PoCT	Point-of-care testing
RNA-VHC	RNA del virus de la hepatitis C
RIC	Rango intercuartílico
RDTs	Rapid diagnostic tests
RVS	Respuesta viral sostenida
PQID	Personas que se inyectan drogas
PIJ	Programa de intercambio de jeringas
PMM	Programa de mantenimiento de metadona



Abreviaturas

UI	Unidades internacionales
UTR	Untranslated region
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

RESUMEN

La hepatitis C es una de las causas principales de cirrosis y carcinoma hepatocelular a nivel mundial. En 2016, la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** elaboró un plan estratégico para la eliminación de las hepatitis virales como problema de salud pública, en el cual se establecían entre sus objetivos principales alcanzar tasas del 90% de diagnóstico y 80% de tratamiento para el 2030. Para ello, se necesita llevar a cabo el abordaje más adecuado en cada escenario, a través de estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento innovadoras.

La presente tesis doctoral se centra en la mejora del diagnóstico y caracterización de la epidemia por el virus de la hepatitis C (VHC) en personas que se inyectan drogas (PQID). Este colectivo representa uno de los focos más importantes en la epidemia por VHC, especialmente en países de rentas altas, donde el uso de drogas por vía parenteral constituye la primera causa de infección por el VHC. Las PQID presentan un alto riesgo de contraer el VHC, y se calcula que el 39,2% de las PQID están infectadas por el virus a nivel mundial. No obstante, las tasas de diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C en esta población siguen siendo muy bajas. Este colectivo es vulnerable a la pobreza, a otros problemas de salud y a la estigmatización social. Además, las PQID tienen que hacer frente a múltiples barreras (sociales, administrativas, sanitarias y/o estructurales) que dificultan su acceso al sistema sanitario convencional. Por lo tanto, el diseño de estrategias simples y descentralizadas son claves para llevar a cabo los planes de eliminación propuestos por la OMS.

En Cataluña existe una red de centros de reducción de daños (CRD), integrada dentro de una red pública de recursos (Red de Atención a las Drogodependencias) que se encarga de la atención y el seguimiento de problemas relacionados con el consumo, el abuso y/o la dependencia de sustancias psicoactivas. Uno de los servicios que ofrecen los CRD es la prueba rápida de detección de anticuerpos contra el VHC (anti-VHC). Además, desde el año 2008 se realiza el estudio REDAN de monitoreo bio-conductual en PQID que acuden a servicios de reducción de daños. Este ha permitido analizar la tendencia de la seroprevalencia por VHC en este colectivo, del 65,8% en el corte transversal 2014-2015. No obstante, la prevalencia de infección virémica era desconocida debido a la falta de confirmación del RNA del virus de la hepatitis C (RNA-VHC), que se realiza en centros de salud especializados, a los que este colectivo no se acude habitualmente.

Por ello, el plan estratégico elaborado por la OMS en 2016 fomentaba el uso de algoritmos diagnósticos y ensayos alternativos simples, fiables y asequibles incluyendo el uso de **muestras mínimamente invasivas de sangre seca (*dried blood spots, DBS*)**, con el fin de facilitar el acceso al diagnóstico y aumentar la tasa de tratamiento en esta población. En 2015, nuestro grupo adaptó y validó una técnica de PCR en tiempo real para la detección cualitativa del RNA-VHC a partir de DBS como estrategia alternativa para mejorar el diagnóstico de la hepatitis C en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) VIH negativos que acudían a ONGs en Barcelona (estudio *HepCdetect I*) (1). Esta técnica, con un límite inferior de sensibilidad (LID) de 541 UI/mL de sangre, mostró una

sensibilidad y especificidad excelentes (100%) en pacientes de consultas externas de hepatología de nuestro Hospital.

En este contexto, en 2015 se diseñó el estudio HepCdetect II (**Artículos I y III**), llevado a cabo en PQID que acudían a CRD en Cataluña, con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la infección virémica por VHC y caracterizar la epidemia de hepatitis C en esta población.

En primer lugar nos propusimos validar en vida real la técnica de RNA-VHC en muestras de DBS en PQID que acuden a CRD de Cataluña y evaluar la utilidad de la detección en un único paso del RNA-VHC en DBS como estrategia de cribado y confirmación diagnóstica del VHC alternativa al algoritmo clásico en dos pasos (serología y si positiva realización de la carga viral en plasma) (**Artículo I**). Para ello, se reclutaron 410 PQID en activo en cuatro CRD de la provincia de Barcelona en el periodo 2016-17. Se recogieron muestras de DBS para todos los participantes y plasma para 300. Se realizó la detección cualitativa del RNA-VHC en DBS a partir del ensayo puesto a punto previamente en el laboratorio y la cuantificación de la carga viral del VHC en plasma utilizando un ensayo comercial (Abbott RealTime™ HCV).

La detección de RNA-VHC en DBS mostró una especificidad del 100% respecto al plasma. Para el análisis de la sensibilidad se consideraron diferentes puntos de corte de carga viral con interés clínico/epidemiológico; respecto al punto de corte propuesto por la OMS (3.000 UI/mL) para el uso de ensayos de detección del RNA-VHC, con el objetivo de expandir el acceso al diagnóstico, el ensayo en DBS mostró una sensibilidad del 97,2% (171/176).

Posteriormente, quisimos evaluar el rendimiento del diagnóstico en un único paso (detección directa del RNA-VHC en DBS) como estrategia alternativa de cribado y confirmación diagnóstica en comparación al algoritmo diagnóstico convencional en dos pasos en la población de estudio. Al comparar la proporción de casos virémicos entre las dos estrategias no se observaron diferencias significativas ($p=0,230$). Además, la detección directa del RNA-VHC a partir de DBS permitió identificar 15 casos con infección virémica y prueba rápida de anticuerpos negativa.

En conclusión, las muestras de DBS tienen el potencial de descentralizar el diagnóstico del VHC, reducir pérdidas en el seguimiento e incrementar el número de PQID que son conscientes de su estado. No obstante, el uso de DBS requiere de un laboratorio central al que enviar las muestras, y de una segunda visita al CRD por parte de los las PQID para conocer el resultado de la prueba. En el **Artículo I** fuimos capaces de evaluar la tasa de entrega del resultado de RNA-VHC en el centro A en una segunda visita, que fue posible en el 76,0% de los individuos virémicos.

En este contexto, en 2018 nos planteamos ir un paso más allá y evaluar el ensayo *point-of-care* **Xpert® HCV VL Fingerstick** (Xpert FS), el cual necesita de un equipo de GeneXpert y que integra la extracción de los ácidos nucleicos, la retro-transcripción, la amplificación y la detección del RNA-VHC en muestras de sangre capilar, y permite dar resultados *in-situ* en aproximadamente una hora. En el **Artículo II** comparamos dos estrategias de cribado y diagnóstico de la infección virémica del VHC en un único paso en PQID que atendían el CRD A, a partir de: 1) la detección del RNA-VHC en sangre capilar fresca por el ensayo Xpert FS mediante el equipo GeneXpert instalado en el

CRD A, y 2) la detección del RNA-VHC en sangre capilar seca recogida como DBS en el CRD A mediante la técnica validada previamente en PQID en el **Artículo I**. Los dos ensayos fueron comparados con el método de referencia realizado en muestras pareadas de plasma, mediante el ensayo Xpert® HCV VL.

La especificidad del ensayo Xpert FS fue del 100% (IC95%, 90,1%-100%). La sensibilidad del ensayo se evaluó utilizando diferentes puntos de corte de carga viral con interés clínico/epidemiológico, como en el **Artículo I**. Cuando se utilizó como referencia el resultado de carga viral detectable por el ensayo en plasma, la sensibilidad fue del 98,4%, mostrando una concordancia muy buena entre ambos métodos (Kappa=0,979). Además, la correlación entre los resultados de carga viral obtenidos por ambos métodos fue significativa (rho de Spearman, $r=0.87$), con un sesgo de $-0,0659$ Log (IU/mL) del ensayo Xpert FS respecto al método de referencia (IC95%: $-0,69898 - 0,56718$).

Cuando se comparó la sensibilidad del ensayo Xpert FS con la sensibilidad de la detección de RNA-VHC en DBS para cada cut-off de carga viral, no se encontraron diferencias significativas. Por otro lado, la prueba en DBS mostro un 2,0% de resultados inválidos, frente al 11,5% del ensayo Xpert FS. Tampoco se detectó influencia del genotipo o la coinfección por VIH en la detección del RNA-VHC por ambos ensayos.

También se evaluó la entrega de los resultados del ensayo Xpert FS, que fue posible en el 100% de los participantes, y en el 80% de los casos se entregó el mismo día de la prueba. Como resultado de la presente intervención, se diagnosticaron 34 nuevas

infecciones virémicas por VHC (54,8% del total de participantes virémicos), que no eran conscientes del propio estado frente a la hepatitis C, y el 98,4% de los casos virémicos que no estaban previamente vinculados al sistema sanitario fueron derivados.

Por último, se preguntó a los participantes sobre las preferencias en cuanto a la entrega de los resultados. El 50,0% de los participantes prefirió recibir el resultado el mismo día, aunque cuando se tuvo en cuenta el conocimiento del propio estado frente al VHC, el 59,4% de los que desconocían su estado (fuera virémico o no) preferían recibir los resultados el mismo día vs. el 33,3% de los que sí eran conscientes de su estado ($p=0,012$).

En conclusión, en el **Artículo II** mostramos que los dos ensayos basados en la obtención de sangre capilar en PQID (PoCT y DBS) son aceptados por las PQID y presentan una fiabilidad elevada para la detección del RNA-VHC. Las dos estrategias ayudarían a reducir potencialmente el número de individuos que no alcanzan un diagnóstico confirmado y, en consecuencia, aumentaría el número de PQID con hepatitis C que son conscientes de su estado y que pueden ser vinculados al tratamiento.

A fin de caracterizar la epidemia de hepatitis C en PQID que acuden a CRD en Cataluña, en el **Artículo I** calculamos la seroprevalencia del VHC en la población de estudio, que fue del 79,8%, y por primera vez se describió la prevalencia de la infección virémica a partir de la detección directa del RNA-VHC en DBS, que fue del 58,5%. Por otro lado, el 35,8% de los participantes con una infección virémica por VHC desconocían su estado,

aunque no se identificaron factores sociodemográficos o de comportamiento asociados. Entre los participantes con una infección pasada o actual por el VHC, el 29,0% declaró haber recibido tratamiento para la hepatitis C.

Por último, nos planteamos llevar a cabo un estudio de epidemiología molecular con el objetivo de caracterizar la epidemia local por VHC y proporcionar información relevante para el diseño de estrategias específicas de prevención y tratamiento **(Artículo III)**. Para ello se diseñó una aproximación basada en la secuenciación masiva (*next-generation sequencing*, NGS) de la región NS5B del VHC, a partir de la cual se estimaron parámetros de diversidad genética inter-hospedador (a nivel de genotipo y subtipo) e intra-hospedador (a nivel de cuasiespecies). En total, se secuenciaron 171 muestras de plasma y 49 muestras de DBS de individuos con infección virémica por VHC procedentes del estudio *HepCdetect II* **(Artículo I)**.

Con el objetivo de validar el DBS para el estudio de la diversidad genética inter- e intra-hospedador, se seleccionaron muestras pareadas de DBS y plasma de 16 participantes del estudio *HepCdetect II*. En cuanto al análisis de diversidad genética inter-hospedador, todos los resultados de genotipado y subtipado del VHC obtenidos mediante el análisis filogenético de las secuencias consenso de NGS de DBS y plasma fueron concordantes. Para el análisis de diversidad intra-hospedador se utilizó el estimador de diversidad genética Entropía de Shannon (ES), que se calculó a partir de los datos obtenidos de NGS. Después de la normalización de las lecturas obtenidas, las medidas de ES no mostraron diferencias significativas entre las muestras de plasma y DBS ($p=0,734$).

Una vez demostrada la validez de las muestras de DBS para el estudio de la diversidad genética, se identificaron los genotipos y subtipos del VHC circulantes en la población de estudio. Para el estudio de la diversidad inter-hospedador se desarrolló una nueva herramienta (HCVGenotool) cuyo uso no requiere de personal bioinformático especializado, con el fin de facilitar la identificación del genotipo/subtipo del VHC a partir de los datos obtenidos de NGS. Los resultados obtenidos del HCVGenotool concordaron con la técnica de referencia (análisis filogenético realizado a partir de las secuencias consenso obtenidas de NGS). El subtipo mayoritario fue el 1a (38,2%), seguido del 3a (33,6%) y el 1b (16,4%). Además, se detectaron cinco infecciones mixtas (2,2%).

Posteriormente, nos propusimos identificar las infecciones agudas con el fin de caracterizar las PQID que se habían infectado recientemente y posteriormente su perfil, lo que permitiría generar información válida para el diseño y monitorización de intervenciones específicas de prevención y tratamiento. Para este análisis nos planteamos utilizar el estimador de diversidad intra-hospedador ES como un marcador alternativo de infección aguda, en base a que la diversidad intra-hospedador aumenta proporcionalmente con el tiempo de infección, y en consecuencia, tiene el potencial de diferenciar las infecciones agudas de las crónicas a nivel poblacional.

La determinación del punto de corte óptimo del valor de ES para diferenciar a nivel poblacional las infecciones agudas (<6 meses de infección) de las crónicas (≥ 6 meses de infección) se obtuvo a partir de 15 controles de infección aguda y 40 de infección crónica. De esta manera, se estableció un valor de *cut-off* para el cual se obtuvo una

sensibilidad del 93,3% intervalo de confianza (IC) (IC 95%: 0,81 - 1,06) y una especificidad del 95,0% (IC 95%: 0,88 - 1,02) para la identificación de la infección aguda mediante un análisis de curva ROC (*receiver operating characteristic curve*). Al aplicar este *cut-off* en la población de estudio, el 13,5% (29/215) de los participantes con infección virémica fueron identificados como infecciones agudas, frente al 1,8% (4/215) si se hubiera aplicado el método de referencia, es decir, la presencia de RNA-VHC dentro del periodo ventana de anticuerpos.

La identificación de los individuos con infección aguda y el cálculo del tiempo en el cual el estimador de diversidad genética ES permanecía por debajo del *cut-off* establecido en los controles de infección aguda y crónica permitió estimar la incidencia del VHC en un estudio transversal, que osciló entre 31 y 59/100 personas/año.

También se llevó a cabo un análisis filogenético a partir de los datos de NGS, con el objetivo de entender la transmisión del VHC a nivel poblacional y complementar la información obtenida de la identificación de infecciones agudas. Para el estudio de epidemiología molecular se utilizaron los datos obtenidos por NGS de la región NS5B del VHC, lo que permitió describir que el 46,8% de los individuos con infección virémica formaban parte de un *cluster* de transmisión.

Además, observamos que los individuos con infección aguda era más frecuente que formaran un *cluster* con otro caso de infección aguda que con aquellos con infección crónica ($p=0,001$).

Por último, identificamos los determinantes de infección aguda y *clustering* filogenético. La infección aguda se asoció a la edad ≤ 30 años (*adjusted odds ratio* (AOR)=8,09), no inyectarse diariamente (AOR=4,35), ≤ 5 años de consumo de drogas inyectables (AOR=3,43), compartir rulo para esnifar cocaína (AOR=2,89) y a desconocer el estado de la infección virémica por VHC (AOR=3,62).; la edad ≤ 30 años (AOR=6,16), la infección aguda (AOR=5,73) y la infección por el subtipo 1a (AOR=4,78) se asociaron independientemente con el *clustering* filogenético.

En conclusión, en el **Artículo III** se validó por primera vez la muestra de DBS para el estudio de la diversidad genética inter-hospedador y intra-hospedador del VHC utilizando NGS. Esto permitió identificar marcadores claves para caracterizar la transmisión local del VHC y monitorizar la eficacia de las intervenciones específicamente dirigidas, así como la identificación de infecciones agudas y *clusters* de transmisión y la incidencia del VHC, calculadas a partir de un enfoque novedoso basado en marcadores de diversidad genética en un estudio transversal. Junto con los estimadores epidemiológicos clásicos, los análisis realizados en el **Artículo III** constituyen una herramienta poderosa para caracterizar la epidemia de VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña.

ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA LA TESIS

Artículo I

Utility of a one-step screening and diagnosis strategy for viremic HCV infection among people who inject drugs in Catalonia.

Saludes V, **Antuori A**, Folch C, González N, Ibáñez N, Majó X, Colom J, Matas L, Casabona J, Martró E.

International Journal of Drug Policy 2019; 74: 236-245.

Artículo II

Evaluation of the Xpert HCV VL Fingerstick point-of-care assay and dried blood spot HCV-RNA testing as simplified diagnostic strategies among people who inject drugs in Catalonia, Spain.

Saludes V, **Antuori A**, Lazarus JV, Folch C, González-Gómez S, González N, Ibáñez N, Colom J, Matas L, Casabona J, Martró E.

International Journal of Drug Policy 2020 Jun; 80: 102734.

Artículos en los que se basa la tesis

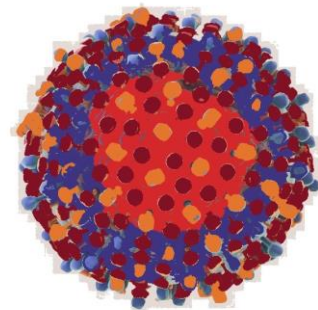
Artículo III

Characterization of Acute HCV Infection and Transmission Networks in People Who Currently Inject Drugs in Catalonia: Usefulness of Dried Blood Spots

Antuori A, Montoya V, Piñeyro D, Sumoy L, Joy J, Kraiden M, González-Gómez S, Folch D, Casabona J, Matas L, Colom J, Saludes V, Martró E.

Hepatology 2021 Aug; 74(2): 591-606.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El virus de la hepatitis C

1.1.1. Descubrimiento y origen

El VHC es un virus RNA perteneciente al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Nuevas evidencias datan el origen del VHC hace 450.000 años, anterior a la supuesta migración de los humanos modernos fuera de África (2). Desde el descubrimiento del VHC como agente causal de la hepatitis C, hasta el tratamiento de alta eficacia con los antivirales de acción directa (AAD), la investigación biomédica llevada a cabo entorno al VHC constituye uno de los hitos más exitosos en el campo de la virología, fruto de una investigación básica y aplicada eficientes, recompensado recientemente con el Premio Nobel de Medicina (3). El **VHC** fue descubierto en 1989 gracias a la aplicación de técnicas moleculares de clonaje y secuenciación y fue denominado inicialmente como virus de la hepatitis no-A, no-B (4), 14 años después del reconocimiento de la hepatitis no-A, no-B como enfermedad (5). Pronto surgieron evidencias sólidas de la asociación del virus y la hepatitis aguda y crónica que producía (6), así como del cáncer hepático (7). No obstante, la dificultad técnica para llevar a cabo modelos *in vivo* (8,9), y especialmente *in vitro* (10,11), obstaculizó durante muchos años el estudio del ciclo celular y la estructura del virus necesario para el desarrollo de antivirales específicos.

1.1.2. Clasificación taxonómica, estructura y organización genómica del VHC

El VHC es un virus con envuelta. Los primeros análisis por microscopía electrónica mostraron partículas esféricas de unos 33-70nm (12). Sin embargo, datos posteriores sugirieron que el VHC tenía una estructura pleomórfica, con una capa lipídica que contiene el heterodímero funcional formado por las glucoproteínas E1 y E2, que están implicadas en la entrada del virus al hepatocito y es diana de los anticuerpos neutralizantes producidos por el hospedador (13). Bajo la membrana lipídica se encuentra la nucleocápside, compuesta por múltiples copias de la proteína core que rodean el material genético.

El genoma del VHC consiste en una única molécula de RNA lineal de cadena simple, polaridad positiva y de aproximadamente 9,600 nucleótidos(14), con un marco abierto de lectura de unos 9.000 nucleótidos de longitud, flanqueado por dos regiones no traducidas altamente conservadas en los extremos 5' (*5' untranslated region, UTR*) y 3' (*3' untranslated region, UTR*)(15). En la región 5'UTR se encuentra una región altamente conservada de 341 nucleótidos conocida como sitio de entrada del ribosoma interno (*internal ribosome entry site, IRES*), que permite la unión directa con la subunidad ribosómica 40S. La traducción del marco abierto de lectura da lugar a una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos cuyo procesamiento por proteasas da lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (**Figura 1**) con diferentes implicaciones en el procesamiento viral, la replicación y el ensamblaje del virus (16). Brevemente, P7 se trata de un polipéptido hidrófobo que funciona como una canal iónico y tiene implicación en la

producción *in vivo* de partículas infecciosas, y NS2 está implicado en procesos de ensamblaje, envuelta, maduración y liberación del virus. NS3 es una proteína multifuncional con actividad serín-proteasa, que actúa tanto en proteínas virales como del huésped y está implicada en la evasión del sistema inmune innato. La proteína NS4A actúa como cofactor de la serín-proteasa NS3A. NS4B interviene en la replicación viral, la modulación del sistema inmune del huésped y el ensamblaje del virus. La proteína no estructural NS4B está involucrada en la formación del complejo de replicación, en el ensamblaje de los viriones, así como en la inhibición de la respuesta inmune innata. La proteína NS5A está involucrada en la capacidad replicativa del virus, en la formación de los viriones, la modulación de las vías de señalización celular, la propagación del virus y la respuesta al interferón alfa (IFN- α). Por último, NS5B codifica para la polimerasa viral (RNA polimerasa RNA-dependiente) (16).

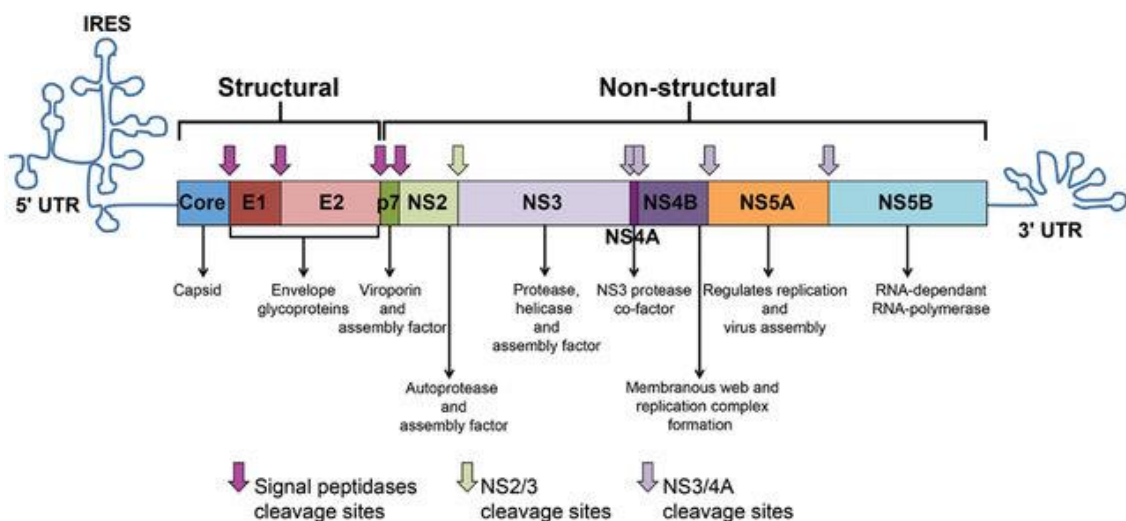


Figura 1. Genoma del VHC. Fuente: MS Abdel-Hakeem *et al.*, 2014 (17).

1.1.3. Variabilidad genética del VHC y distribución en cuasiespecies

La evolución del VHC, como la de otros virus RNA, está sometida a un conjunto de procesos dinámicos que determinarán su **variabilidad genética**. La elevada tasa de sustitución nucleotídica a lo largo del genoma (estimada alrededor de $1,5-2,5 \times 10^{-3}$ sustituciones por posición nucleotídica por año (16) se debe, principalmente, a la falta de actividad reparadora de errores (ausencia de actividad exonucleasa 3'-5') de la enzima RNA polimerasa RNA-dependiente y a la elevada tasa de replicación del virus, con una producción diaria de $10^{10}-10^{12}$ viriones. Otro factor relevante en la generación de variabilidad genética en el VHC es la **recombinación genética**, que puede tener lugar durante la elongación del RNA en la replicación, en la que la polimerasa se traslada de una molécula o virus "donante" a otro "receptor", resultando en una nueva molécula de RNA con rasgos de ambos progenitores (18). No obstante, este evento es poco frecuente en el VHC, en el que es necesario una coinfección de la misma célula para que suceda (19,20). Sin embargo, la recombinación se ha descrito tanto a nivel inter-genotípico como intra-genotípico(21) (entre subtipos), siendo la región localizada entre los genes NS2 y NS3 especialmente susceptible a este suceso (19). La variante recombinante con más impacto en la epidemiología global es la RF1_2k/1b, caracterizada en 2002 por Kalinina *et al.* en San Petersburgo (22). A pesar de aislarse de forma puntual en muchos países, está presente en un porcentaje alto en países de Europa del Este como en Georgia, donde puede llegar al 20% de los aislados (23).

A nivel inter-hospedador, en 2005 P. Simmonds *et al.* propusieron una nomenclatura consenso basada en **genotipos** (difieren entre un 31-33% a nivel de secuencia

nucleotídica) y **subtipos** (15-25% de diferencias nucleotídicas en el genoma) (24). Así, la asignación de nuevos genotipos y subtipos requería de (i) la identificación de tres aislados sin relación epidemiológica para nuevos subtipos y uno para nuevos genotipos (asignación provisional), (ii) la obtención de al menos una secuencia completa y de otras dos de las regiones core/E1 y NS5B, (iii) la evidencia de un nuevo clado filogenético a través de varios métodos de análisis, y (iv) la exclusión de presencia de recombinación intra- e inter-genotípica. Una actualización del documento realizada por el mismo grupo en 2014 confirmó siete genotipos, 67 subtipos, 20 subtipos provisionales y 21 subtipos sin asignación. Además, se establecieron algunas modificaciones en cuanto a la asignación de nuevos subtipos y genotipos, entre las que se destaca la necesidad de secuenciar tres genomas enteros para la asignación provisional de nuevos subtipos (25). Recientemente se ha descrito un nuevo genotipo, clasificado como genotipo 8, en cuatro pacientes de la región del Punjab en India sin relación epidemiológica (26) (**Figura 2**). En la última actualización llevada a cabo por el Comité internacional de Taxonomía de los Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) en Mayo del 2019, se documentaron ocho genotipos y 90 subtipos diferentes del VHC [https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification, visitado el 09/08/2021].

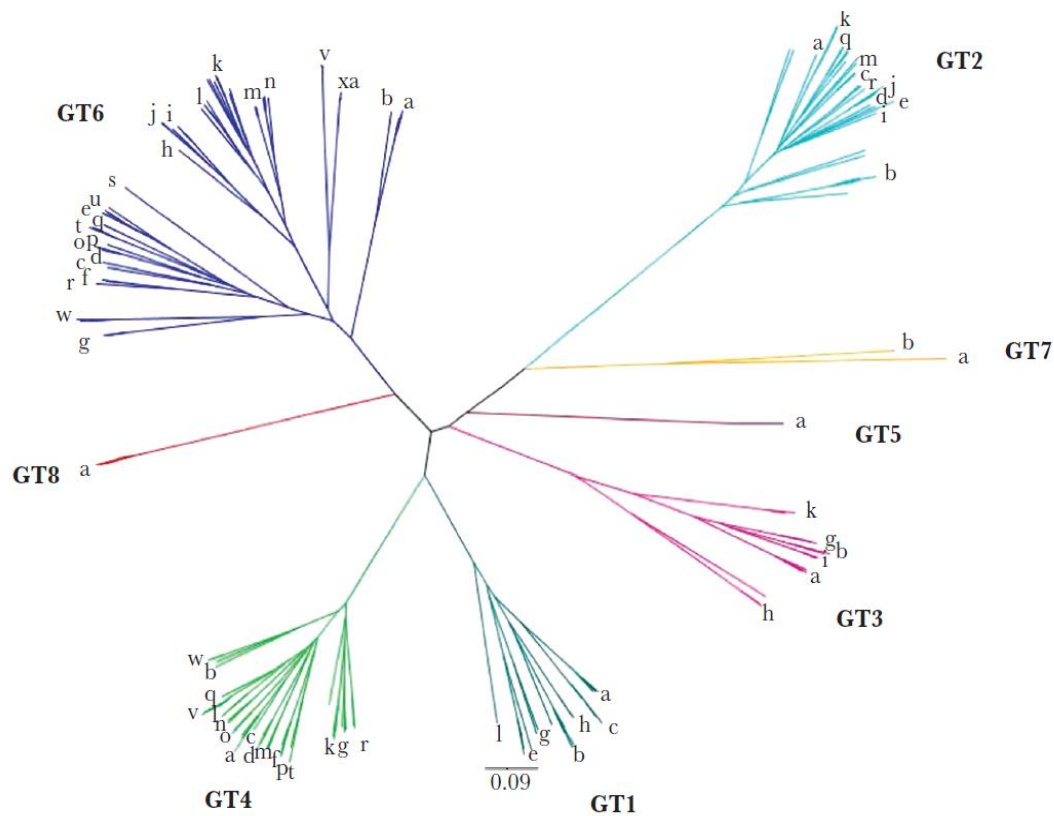


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir de las secuencias genómicas codificantes completas del VHC aislados de 170 pacientes en el que se representan los ocho genotipos del VHC. Fuente: S. Borgia *et al.*, 2018 (26).

A nivel de individuo, coexiste una población de variantes virales estrechamente relacionadas entre sí (diversidad intra-hospedador). La población *in vivo* de dichas variantes se conoce con el nombre de **cuasiespecies**, término acuñado por primera vez por M. Eigen *et al.* para referirse a esta estructura poblacional en un marco matemático formulado para explicar la evolución de la vida en el mundo pre-celular en el que los primeros objetos con capacidad de replicación autónoma se suponían iguales o similares al RNA (27–29). Dicha teoría se utilizó posteriormente para describir

la dinámica evolutiva de los virus RNA, entre los que se encuentra el VHC (30–32). La población de cuasiespecies tiene que entenderse como una unidad, en la que la dinámica de la distribución de las variantes está sujeta a variación, competición y selección. En esta, variantes con menor adaptación al ambiente pueden sobrevivir a este por el hecho de estar rodeadas de un espectro poblacional de variantes mejor adaptadas, fenómeno llamado acoplamiento mutacional (31). Otra característica importante en la dinámica de las cuasiespecies es la existencia de un límite de error en el que el virus preserva su información genética, más allá del cual lleva a su extinción, llamado mutagénesis letal (33). La teoría de las cuasiespecies promulga, que, en ambientes dinámicos (sistema inmune), las altas tasas de mutación (originadas por la falta de fidelidad de la polimerasa en los virus RNA) favorecen la supervivencia de la población frente a una población homogénea menos flexible a las variaciones ambientales (34), constituyendo uno de los principales problemas en cuanto a la respuesta eficaz del sistema inmune del hospedador frente al virus, por lo que en la mayoría de casos el virus conseguirá establecer una infección crónica (16) (se describe en el **apartado 1.2.1**).

1.1.4. Estudio de la variabilidad genética

El estudio de la **diversidad genética de una población viral** supone determinar la frecuencia de cada una de las variantes presentes en la misma y los polimorfismos entre las variantes. Para su análisis se han desarrollado diferentes estimadores, como la Entropía de Shannon (ES). La ES mide la diversidad de la población en su conjunto a

partir de la relación entre el sumatorio de la frecuencia observada de las diferentes variantes o haplotipos en una población y el número total de haplotipos, normalizado en una escala del 0 al 1 (16).

Más allá de la discusión originada en el plano teórico de las cuasiespecies, su estudio experimental no está exento de complicaciones técnicas. Hasta el 2005 y la aparición de nuevas tecnologías de secuenciación masiva, la técnica de referencia para el estudio de las cuasiespecies circulantes era un proceso largo y laborioso basado en la clonación de los productos obtenidos a partir de la transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, *reverse transcription-polymerase chain reaction*). En esta, el producto de PCR obtenido es clonado en un plásmido vector que se utiliza para transformar una bacteria que es cultivada. Una vez crecida, se lleva a cabo la secuenciación Sanger del inserto (fragmento del VHC) que corresponderá a una variante única de la población de cuasiespecies circulante en el individuo infectado (35). No obstante, este método requiere el análisis de al menos 20 clones para alcanzar una representación del 95% de las variantes (aquellas con $\geq 10\%$ de frecuencia relativa dentro de la población viral), sin embargo, la mayoría de las variantes minoritarias no son detectadas (36).

La secuenciación Sanger, descrita en 1977 por F. Sanger et al.(37), se basa en la lectura de la información genética del ADN mediante el empleo de dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia que interrumpen la elongación de la nueva cadena de ADN durante la reacción de secuenciación utilizando un solo cebador, seguido de una electroforesis capilar de los diferentes fragmentos de ADN generados y lectura de la

señal fluorescente del terminador incorporado en cada uno de ellos, que permite la obtención de secuencias de hasta unas 1.000 bases de longitud.

En el 2005, el nacimiento de la nueva tecnología de secuenciación masiva, secuenciación de nueva generación (NGS) o de segunda generación, supuso un avance en la capacidad de secuenciar en paralelo múltiples genomas o amplicones, procedentes tanto de una misma muestra como de diferentes muestras simultáneamente gracias a la preparación previa de unas librerías etiquetadas con diferentes índices (multiplexado) (38). Además, esta tecnología permitió la secuenciación de genomas completos de virus y de bacterias sin necesidad de cebadores específicos (39).

De forma general, para el proceso experimental de secuenciación masiva del VHC que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral, en primer lugar, se generan amplicones de 389 pares de bases de la región NS5B mediante unos cebadores, que tienen una región complementaria al genoma del VHC y otra a los identificadores de Illumina (*overhangs*). Posteriormente, a partir de estos amplicones, se preparan las librerías de secuenciación añadiéndoles en cada uno de sus dos extremos (3' y 5') identificadores únicos mediante una PCR de pocos ciclos. Estos identificadores permiten secuenciar múltiples muestras a la vez, ya que permitirán identificar la muestra a la que pertenece cada fragmento secuenciado una vez se han generado las lecturas en el secuenciador. Así mismo, también permiten la fijación de los fragmentos a secuenciar a una superficie bidimensional (*flow cell*), ya que su secuencia es complementaria a la de unos oligonucleótidos inmovilizados en esta superficie. Posteriormente se lleva a cabo



una reacción de amplificación clonal en paralelo de todos los fragmentos fijados en la *flow cell* mediante una amplificación en puente (*bridge amplification*), lo que permitirá amplificar la señal generada por cada *cluster* durante la secuenciación. Finalmente, una vez amplificados los fragmentos de DNA, se produce la reacción de secuenciación en sí, denominada secuenciación por síntesis (SBS, *sequencing by synthesis*). Ésta consiste en la incorporación secuencial de nucleótidos marcados con fluoróforos distintos (A, C, T y G) que tienen una acción terminadora reversible. Para iniciar este proceso, se utilizan cebadores de secuenciación que son complementarios a un fragmento del adaptador que se añade al generar las librerías, lo que permite la adición de los nucleótidos marcados antes mencionados. De esta forma, en cada ciclo de secuenciación se produce la adición de un único nucleótido a cada uno de los fragmentos en síntesis cuya señal fluorescente es captada y traducida a nucleótidos (40) **(Figura 3)**.

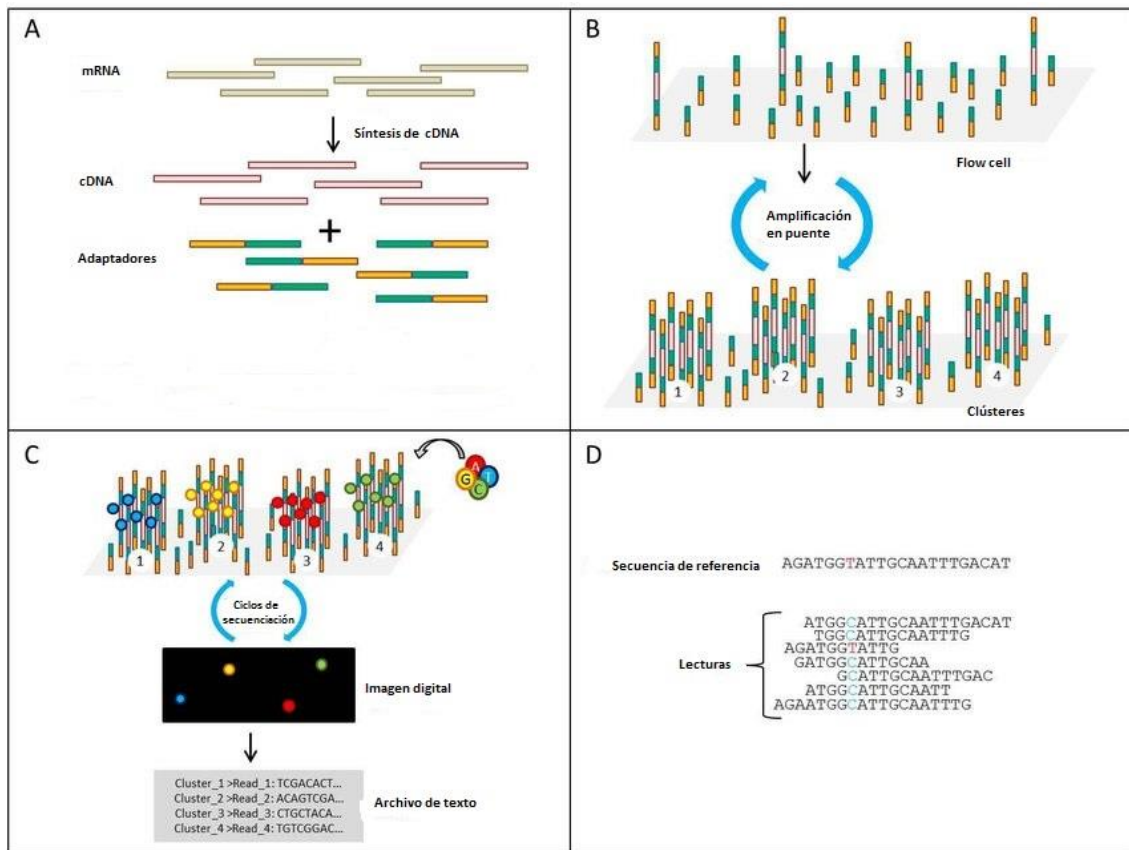


Figura 3. Representación gráfica del proceso experimental de secuenciación masiva del VHC que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral. a) generación de librerías; b) amplificación clonal en puente; c) secuenciación por síntesis; d) análisis bioinformático. Adaptado de S. Goodwin *et al.*, 2016 (40).

A pesar de la gran capacidad de la NGS para generar miles de secuencias en un único proceso, esta novedosa técnica también presenta una mayor tasa de error en relación a la secuenciación Sanger. No obstante, las técnicas basadas en NGS permiten establecer diferentes criterios de calidad con el objetivo de obtener las secuencias con una calidad de lectura óptima, así como posteriores procesos de filtrado basado en múltiples parámetros, como por ejemplo la longitud de la lectura. El análisis

bioinformático de los datos es un proceso complejo que en la mayoría de ocasiones requiere de personal especializado, lo que constituye uno de los principales cuellos de botella para su implementación en los laboratorios de microbiología clínica (41).

Finalmente, la aparición recientemente de la tecnología de secuenciación de tercera generación ha permitido la caracterización de genomas enteros sin necesidad de amplificación previa, mediante la aplicación de diferentes estrategias como la empleada por la plataforma Oxford Nanopore, en la que se produce una desnaturalización de la doble cadena de ADN, y conforme la molécula de cadena única de ADN va atravesando el nanoporo se producen cambios en el voltaje aplicado que pueden medirse y traducirse en la lectura de la secuencia nucleotídica. Aunque está representada una potencial herramienta para la reconstrucción de haplotipos de microorganismos con una diversidad elevada como el VHC (análisis de la evolución de las cuasiespecies, resistencias a antivirales, etc.), la tasa de error es mayor incluso que en la secuenciación de segunda generación, constituyendo un aspecto a mejorar para su implementación definitiva (42).

1.1.5. Filogenias moleculares

Una **filogenia** es la representación gráfica de la distancia evolutiva entre caracteres o secuencias genéticas, a menudo reflejada en forma de árbol que contiene ramas y nodos (**Figura 4**). En este, cada rama representa la persistencia de un linaje genético a través del tiempo, y cada nodo representa el nacimiento de un nuevo linaje. Si el árbol representa la relación entre un grupo de especies, entonces los nodos representan

eventos de especiación. En otros contextos, la interpretación puede ser diferente. Por ejemplo, en un árbol genético de secuencias muestreadas de un población de individuos infectados por el VHC, un nodo representa un evento de transmisión (ancestro común compartido por varias secuencias) (43).

Los árboles filogenéticos son inferidos a partir información incompleta derivada de las secuencias disponibles.

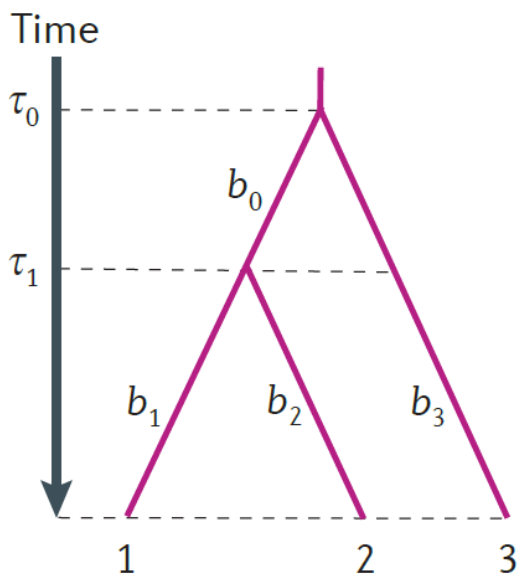


Figura 4. Representación gráfica de un árbol filogenético. Un árbol filogenético representa una historia genealógica en el que cada nodo (ζ) reproduce el nacimiento de un nuevo linaje y cada rama (b) representa el tiempo transcurrido, expresado en número de sustituciones por posición nucleotídica. Adaptado de Z. Yang *et al.*, 2012 (43).

Los **modelos evolutivos de sustitución nucleotídica** se utilizan para calcular la distancia genética entre las secuencias de estudio, con el fin de corregir o compensar las sustituciones no observadas pero que pueden haber tenido lugar a lo largo de la filogenia. De entre los modelos evolutivos más destacados se encuentran el modelo de **Jukes-Cantor** (44), que asume la misma tasa de sustitución entre todos los nucleótidos, el **Kimura-2** (45), en el que las tasas de sustitución son diferentes para

las transversiones y transiciones, o los modelos más avanzados como el modelo **Hasegawa-Kishino-Yano** (46) (**Figura 5**) o el **Generalised time-reversible** (47), en el que la tasa de sustitución es diferente para cada uno de los 6 cambios posibles entre las cuatro bases nucleotídicas. En ausencia de la aplicación de un modelo evolutivo la distancia genética entre dos secuencias es la observada, es decir, que no han tenido lugar sustituciones intermedias, lo que se denomina ***pairwise distance***. No obstante, esto puede llevar a una infraestimación de la verdadera distancia genética, especialmente cuando el tiempo de evolución es grande y/o la tasa de sustitución nucleotídica es alta (48).

La **reconstrucción de un árbol filogenético** a partir del alineamiento múltiple de datos moleculares se basa en modelos de inferencia estadística utilizando un modelo evolutivo y un criterio de optimización con el objetivo de buscar la tipología de árbol que mejor se ajuste a estos datos. La reconstrucción mediante el método ***neighbour joining*** utiliza el criterio de la mínima evolución (*balanced minimum evolution*), en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas (49). Métodos más complejos como los basados en la **máxima verosimilitud** (utilizado en la presente tesis doctoral), se basan en el uso de un valor denominado *log-likelihood* para evaluar topologías alternativas del árbol filogenético con el fin de encontrar aquella que maximiza su valor. Este método permite la inferencia de árboles filogenéticos usando modelos evolutivos complejos, e incluye la posibilidad de estimar los valores de los parámetros del modelo. Por último, la reconstrucción mediante la **inferencia bayesiana** ha cobrado protagonismo recientemente y se fundamenta en la teoría

bayesiana, que, aunque parecida a la máxima verosimilitud, considera la probabilidad previa de los parámetros del modelo en vez de asignarles valores fijos como en la máxima verosimilitud. Esta probabilidad anterior se combina con la información obtenida de los datos de las secuencias disponibles para generar una probabilidad posterior, que es utilizada para construir el árbol filogenético (43).

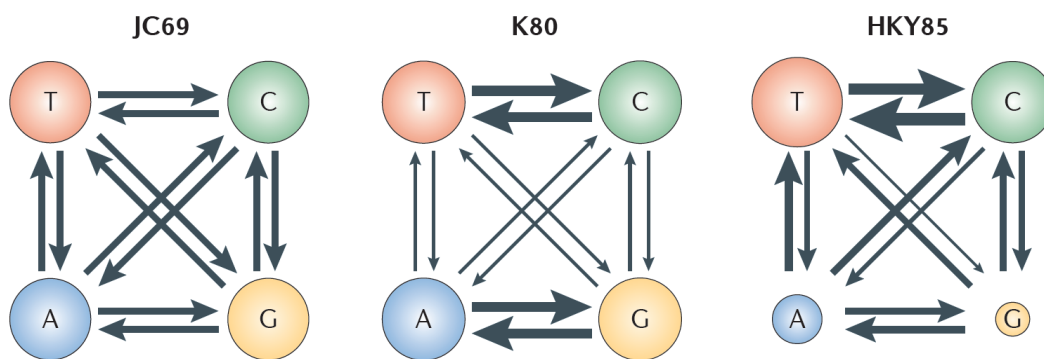


Figura 5. Representación gráfica de diferentes modelos de sustitución nucleotídica.

El grosor de las líneas indica la frecuencia de sustitución entre las bases nucleotídicas, y el tamaño de los círculos representa la frecuencia de los nucleótidos cuando el proceso de sustitución está en equilibrio. Fuente: Z. Yang *et al.*, 2012 (43).

1.1.6. *Clustering* filogenético

La identificación de un *cluster* o grupo de transmisión, es decir, de un evento de transmisión reciente entre dos o más individuos, tiene un importante papel en la caracterización de epidemias o brotes de un agente infeccioso, así como en la determinación de los factores de riesgo asociados a dichos eventos de transmisión(50).

La caracterización de *clusters* de transmisión se puede realizar a través de métodos basados en las **distancias genéticas** (no tienen en cuenta la relación filogenética entre las secuencias) o utilizando los métodos basados en **evaluación de los clados observados** (las secuencias que agrupan en el mismo *cluster* tienen un ancestro común) a partir de la evaluación de la fiabilidad de los nodos internos. Los métodos de distancia aplican un punto de corte por debajo del cual se define un *cluster*. La distancia genética, como ya se ha explicado anteriormente, se puede calcular a través de las diferencias nucleotídicas observadas (*pairwise distance*) (51) o las distancias derivadas de la longitud de rama en un árbol filogenético obtenido mediante la aplicación de un modelo de sustitución nucleotídica (52). Por otro lado, el método basado en la evaluación de la fiabilidad de los nodos internos más utilizado es el **Bootstrap**, con el que se reconstruye el árbol n veces a través de un remplazamiento de las secuencias, obteniéndose la proporción de veces que un determinado clado se repite. Inicialmente, D. Hillis *et al.* estableció un valor de *bootstrap* de $\geq 70\%$ como medida de la fiabilidad de un clado, aunque este valor se tiene que validar en cada contexto específico (53). Para el estudio de *clusters* del VHC algunos autores optan por un valor más conservador (54,55), $\geq 90\%$. Por otra parte, la inferencia bayesiana utiliza la **probabilidad posterior** para determinar la exactitud de un clado dentro de un árbol filogenético (43). En las últimas décadas se han desarrollado algoritmos más sofisticados para el análisis de *clusters*, mediante la **combinación de métodos de distancia y evaluación de los clados**, como el propuesto por S. Hué *et al.*, en el que los autores proponen un valor de *bootstrap* $\geq 90\%$ y una distancia patrística $< 0,015$ para definir *clusters* del VIH (56).

Por otro lado, la **región del genoma seleccionada** tiene un papel relevante en el análisis de *clusters* de los virus RNA, y específicamente del VHC, donde la variabilidad se distribuye de manera heterogénea a lo largo de su genoma. Las regiones más utilizadas son la subregión altamente variable HVR1 dentro de la región E2 y la región semi-conservada NS5B(54,55,57), además del análisis conjunto desde la región core hasta el final de la región E2 que ha demostrado tener una alta resolución para la identificación de transmisiones recientes (58).

La idoneidad del método seleccionado, no obstante, depende en gran medida del objetivo del estudio. Por ejemplo, la subregión HVR1, que es la zona del genoma con mayor variabilidad genética ya que codifica para la región de la proteína E2 reconocida por los anticuerpos neutralizantes, puede ser de gran utilidad para verificar transmisiones muy recientes como las que se producen en un brote nosocomial (59), mientras que regiones más conservadas como la NS5B o core-E2 pueden ser más convenientes para analizar transmisiones más antiguas (55).

Por último, la **tecnología de secuenciación utilizada** es determinante en la caracterización de los *clusters* filogenéticos. Hasta la aparición de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, la técnica de referencia para el estudio de la diversidad genética intra-hospedador y análisis filogenético de *clusters* de transmisión requería de estrategias basadas en la secuenciación Sanger de los productos de amplificación clonados (60,61), aunque, como se ha comentado anteriormente, el proceso de clonación es largo y laborioso y no permite identificar variantes minoritarias (36) (frecuencia relativa <10). Estudios basados en NGS demostraron que

después de un evento de transmisión, la diversidad intra-hospedador del virus es muy limitada, ya que una o pocas variantes son las responsables de establecer la infección en las primeras etapas. Después de este cuello de botella, la diversidad del virus crece exponencialmente (62,63). En este contexto, la NGS ha demostrado una mayor capacidad para representar la diversidad intra-hospedador del virus e inferir la transmisión del VHC por variantes minoritarias (64,65).

1.1.7. Vías de transmisión del VHC

El VHC se transmite principalmente por **vía parenteral**. Las **prácticas médicas no seguras** y el **uso de drogas inyectables** constituyen los dos principales factores de riesgo para la transmisión del VHC en países de media/baja y alta renta, respectivamente (66).

Las prácticas médicas no seguras siguen siendo el principal factor de riesgo para la transmisión del VHC en algunos países del Sudeste Asiático y del Mediterráneo Oriental, donde la reutilización de material inyectable sin esterilizar alcanza el 14% (**Figura 6**). Por otro lado, la transmisión del VHC asociado a las transfusiones de sangre ha disminuido considerablemente a consecuencia de la mejora de los programas de cribado en los donantes, aunque en algunos países de renta media/baja, la proporción de transfusiones sin controles de calidad sigue siendo considerable (66). Personas en **hemodiálisis** (67), o con **trastornos hemorrágicos hereditarios** (como la hemofilia) (68) siguen estando a riesgo de contraer la enfermedad en países de renta baja. A su vez, los **profesionales sanitarios** también presentan un mayor riesgo de infección (una

razón de probabilidad de más del doble que la población normal) tanto en países de renta media/baja como de renta alta (69).

Las **PQID constituyen el núcleo de la epidemia de hepatitis C en zonas de renta alta**, como Europa o los Estados Unidos. En Europa, por ejemplo, se calcula que alrededor de un 44% de las nuevas infecciones están relacionadas con esta vía (70). En Estados Unidos, después de años de clara tendencia descendente, los programas de vigilancia epidemiológica reportaron una duplicación en la tasa de incidencia del VHC en el periodo 2010-2014, debido principalmente al uso de drogas inyectadas (71).

Por otro lado, aunque con menor relevancia en la carga global de la enfermedad, los **trasplantes de órgano sólido (72)** y el **uso de drogas por vía esnifada** constituyen otras dos vías de transmisión del VHC (73). La transmisión por **vía sexual**, si bien es poco frecuente en parejas heterosexuales o HSH VIH negativos, aumentó notablemente en HSH VIH positivos al final de los años 90. La aparición del VHC coincidió con un aumento de las conductas sexuales de riesgo y de las tasas de enfermedades de transmisión sexual entre los HSH debido a la disminución de la percepción de la amenaza del VIH/SIDA por la aparición del tratamiento antirretroviral combinado de alta efectividad (74). Los factores que se han asociado a la transmisión del VHC en esta población son el sexo anal sin protección, la presencia de lesiones ulcerativas causadas por enfermedades de transmisión sexual, el uso de juguetes sexuales o traumas durante el acto sexual o el uso de drogas para la práctica del sexo (Chemsex) (75). En los últimos años, la aparición de la profilaxis preexposición (PrEP) para el VIH ha supuesto un cambio de paradigma en la transmisión del VHC por vía sexual en HSH; la

creciente interacción entre HSH VIH positivos y VIH negativos debido a la PrEP podría desencadenar una epidemia de VHC, como han mostrado algunos estudios, por lo que será necesario reforzar el cribado en la población que recibe esta quimioprofilaxis (76,77).

El VHC también puede transmitirse durante el embarazo (**transmisión vertical**) en el 5%-15% de los casos, con un mayor riesgo de transmisión en caso de coinfección por el VIH o cuando se presentan cargas víricas elevadas (78,79).

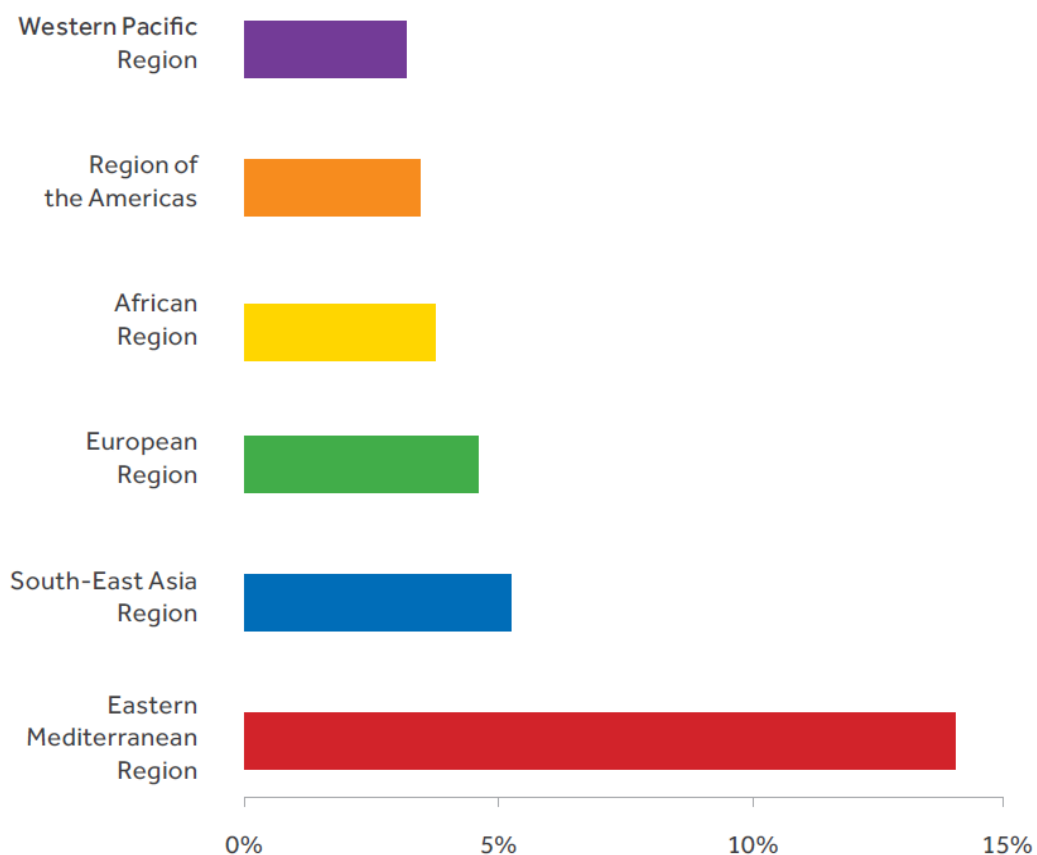


Figura 6. Proporción de material de inyección reutilizado durante las prácticas médicas en diferentes regiones de la OMS. Fuente: Global Hepatitis Report, 2017 (66).

1.1.8. Prevalencia y distribución de la infección por el VHC

De acuerdo con el Observatorio Polaris, la prevalencia global de infección virémica por VHC era del 1% en 2015 (correspondiente a 71.1 millones de personas con infección virémica), con una variabilidad significativa entre países y regiones (80). En un informe posterior, la OMS estimaba que en 2019, 58 millones de personas vivían con el VHC, lo que representa el 0,75% de la población (se calcula que durante el periodo mencionado se han tratado alrededor de 9,4 millones de personas) (81). Según el informe llevado a cabo por el Observatorio Polaris, el mayor número de individuos con infección virémica se concentraban en cinco países: China, Pakistán, India, Egipto y Rusia. Otros países, aunque con un menor número de personas infectadas, destacaban por su alta prevalencia, como Gabón (7%), Siria (3%), Georgia (4,2%), Uzbekistán (4,3%) o Mongolia (6,4%) (**Figura 7**). No obstante, los autores subrayaban en su informe que la falta de datos fiables en determinadas regiones dificultaba una estimación exacta de la prevalencia, como en la India o en la mayoría de países del África subsahariana (80).

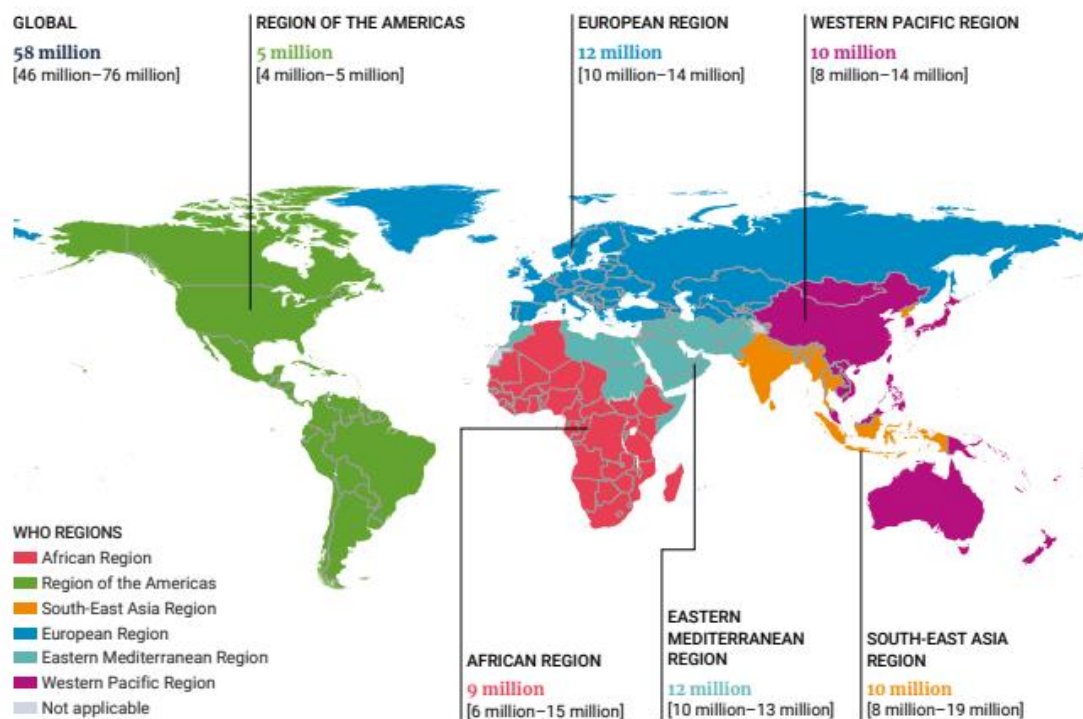


Figura 7. Estimación de casos de hepatitis C crónica en las diferentes regiones de la OMS. Interim guidance for country validation of viral hepatitis, 2019 (82).

A nivel Europeo, en la mayoría de los países la prevalencia de infección virémica se encuentra por debajo del 1,5%, con tasas más altas en países de Europa del Este, como Rumanía (2,5%) o Rusia (3,3%) (80). Según la memoria epidemiológica anual elaborada por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (European Centre for Disease prevention and Control, ECDC), en 2018 se notificaron 37.527 casos en Europa, de los cuales el 4% fueron infecciones agudas. El uso de drogas por vía parenteral constituía la vía de transmisión mayoritaria, seguido de las infecciones asociadas a la transmisión nosocomial y la vía sexual entre HSH (70).

En España, el último estudio de prevalencia de la infección por VHC en la población general se realizó entre mayo de 2017 y 2018, en el que se analizaron 9.103 muestras de personas entre 2 y 80 años de edad que acudían en centros de atención primaria. En este, la seroprevalencia del VHC fue del 0,69% y la prevalencia de infección virémica del 0,17%. Tanto la prevalencia de anti-VHC como de RNA-VHC fue significativamente mayor en hombres que en mujeres. Según el país de nacimiento, la prevalencia de anti-VHC en personas nacidas en España fue del 0,81%, frente al 1,30% nacidas fuera de España, y la prevalencia de infección virémica fue de 0,20% frente a un 0,34%, aunque en ninguno de los dos casos se alcanzó la significación estadística. Además, no se encontró ningún caso confirmado de hepatitis C en menores de 20 años (83). Respecto a los posibles factores de riesgo asociados al VHC, el 63,6% de las personas que contestaron el cuestionario refirió tener algún factor de riesgo incluido en el cuestionario. El antecedente más frecuente, presente en el 32% de las personas encuestadas, fue la acupuntura con agujas, tatuajes o infiltraciones. Por otro lado, el 4,2% se había sometido a alguna prueba diagnóstica o tratamiento invasivo, el 0,8% declaraba haber sido dializado alguna vez y el 0,4% tener hemofilia, aunque no se especificó la fecha para estos antecedentes. Por otro lado, un 8,5% había recibido alguna transfusión (el 37,1% antes de 1992). Como limitaciones los autores referían no haberse recogido las condiciones sanitarias en las que se realizaron estas prácticas, así como la posibilidad de haber dejado fuera a personas de mayor riesgo y que no acuden a los centros de salud del sistema sanitario público (HSH, PQID o extranjeros sin tarjeta sanitaria), por lo que es difícil establecer los factores asociados al VHC en este estudio (83).

En Cataluña, un estudio epidemiológico llevado a cabo en 37 centros de atención primaria entre 2016 y 2018 en población adulta reportó una seroprevalencia del 0,99% y una prevalencia de infección virémica del 0,49% (84), similar a la observada en el último estudio nacional en la población de 20 a 80 años (0,85% de anti-VHC y 0,22% de RNA-VHC) (83). Además, se calculó la reducción de la prevalencia de infección virémica por tratamiento en el periodo de estudio (2016-2018), del 0,69% a 0,49%, ya que casi la mitad de los individuos con RNA-VHC indetectable habían sido tratados con AAD (84).

1.1.9. Distribución de los genotipos del VHC

A nivel global los genotipos mayoritarios son el genotipo 1 (44% del total de infecciones), seguido del genotipo 3 (36%) y el genotipo 4 (15%). El genotipo 1 destaca en la mayoría de países de Asia (centro y sud), Europa, América y el norte de África. Por otra parte, el genotipo 3 destaca en países del sur de Asia y Australia. Por su lado, el genotipo 4 predomina en países del Centro y el Este de la región del África Subsahariana, mientras los genotipos 5 y el 6 están más presentes en países del sur de África y el sudeste asiático, respectivamente (80) (**Figura 8**). Asimismo, queda por determinar la distribución de nuevos genotipos como el 7, que fue identificado por primera vez en personas procedentes de la República Democrática del Congo, y que podría tener un mayor impacto de lo esperado, como muestra un estudio reciente llevado a cabo en el África Subsahariana (85), o del genotipo 8, también identificado

por primera vez en Canadá, en cuatro personas procedentes de la región de Punjab en la India (26).

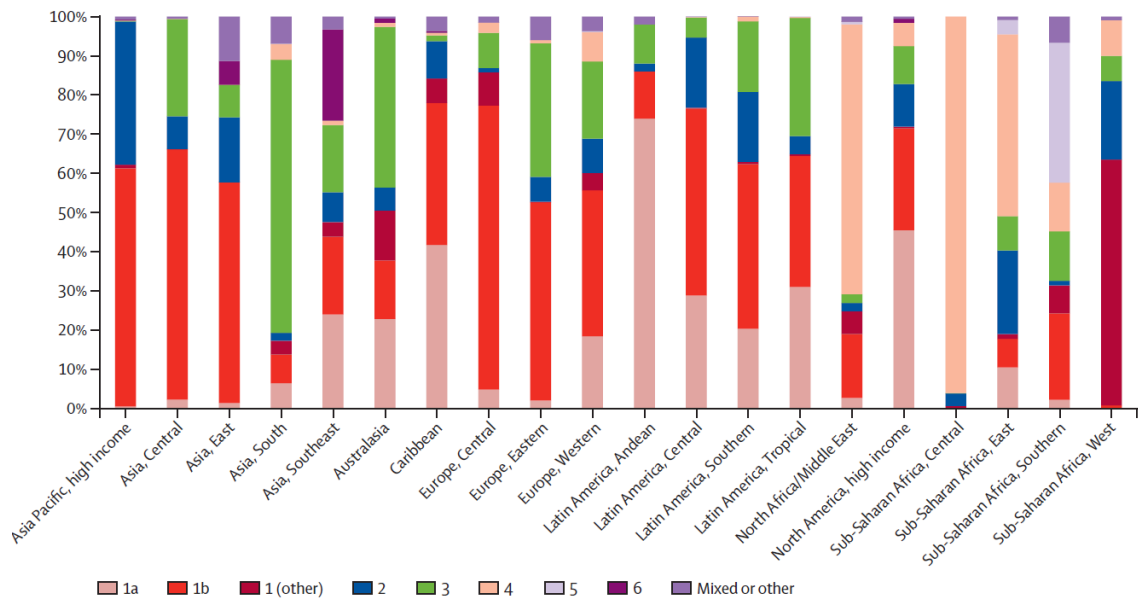


Figura 8. Distribución de genotipos por regiones de la OMS. Fuente: The Polaris Observatory, The Lancet, 2015 (80).

El estudio de los genotipos tiene relevancia a nivel epidemiológico, ya que ciertos genotipos y subtipos se asocian a diferentes vías de transmisión. A nivel español, el Grupo de Estudio de las Hepatitis Víricas (GEHEP) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) llevó a cabo un estudio epidemiológico para conocer la prevalencia y distribución de los diferentes genotipos del VHC en España entre 2000 y 2015 con participación del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, en el que se observó un predominio de los genotipos 1a y 1b,

seguido de los genotipos 3 y 4. Coincidiendo con otros estudios internacionales, los genotipos 1a y 3 se identificaron principalmente en PQID, mientras el genotipo 1b se asoció de manera significativa con la exposición nosocomial (transfusiones y diálisis) en pacientes que habían nacido antes de 1945 y que presuntamente recibieron transfusiones de sangre antes del cribado del VHC en 1992 (86).

1.2. La hepatitis C

1.2.1. Historia natural de la hepatitis C

La infección por VHC tiene un periodo de incubación que oscila entre 2 y 12 semanas. La **hepatitis C aguda** (seis primeros meses de infección) cursa de manera asintomática o con síntomas inespecíficos en aproximadamente el 70% de los casos, lo que dificulta su diagnóstico clínico. Las náuseas, la astenia o el dolor abdominal son los síntomas más frecuentes. Durante la hepatitis C aguda se puede producir un aumento de las transaminasas, con niveles fluctuantes que alcanzan hasta 10-30 veces los valores normales. Por otra parte, la aparición de ictericia se manifiesta en un 20-30% de los casos sintomáticos (87). En la hepatitis C aguda, el RNA-VHC aparece habitualmente a las dos semanas posteriores a la exposición, mientras que los anticuerpos (anti-VHC) son detectados a las 6-12 semanas en la mayoría de los individuos. Los anti-VHC permanecen detectables durante toda la vida en gran parte de las personas infectadas, lo que supone una limitación para el diagnóstico de la enfermedad virémica, cuyo algoritmo se basa clásicamente en la detección de los anti-VHC, y en caso de resultado positivo, debe confirmarse la presencia del RNA-VHC (87).

La infección se limita de manera espontánea en el 15-40% de los casos en la fase aguda. Factores como el género masculino, la presencia de ciertos polimorfismos cerca del gen humano de la interleucina 28B, o la inmunosupresión (tratamiento con corticoides o la coinfección con VIH) se han asociado a una menor probabilidad de aclaramiento espontáneo del virus (88). Asimismo, en el caso del aclaramiento espontáneo, los niveles de RNA-VHC suelen ser indetectables a los tres meses de la infección, no obstante, existe una gran variabilidad inter-individual, ya que en algunos casos se produce el aclaramiento hasta un año (o más) después de la transmisión. Por lo tanto, aunque la bibliografía no aporta datos precisos en cuanto a la duración de la hepatitis C aguda, existe un consenso generalizado que la define dentro de los seis primeros meses de infección (87,88).

En aquellos individuos en que la infección persiste más allá de los seis primeros meses, se establece la **hepatitis C crónica**, proceso progresivo caracterizado por la persistencia de la inflamación hepática y la aparición de la **fibrosis**, que en sus fases más avanzadas, conduce al desarrollo de **cirrosis** en el 10-20% de los casos en un transcurso de tiempo de 20 a 30 años. Una vez establecida la fase de cirrosis, el riesgo anual de desarrollar un **carcinoma hepatocelular** es del 1-5%, y del 3-6% de **descompensación hepática** (en forma de ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, varices hemorrágicas o encefalopatía hepática, entre otras) (**Figura 9**). Tras un episodio de descompensación el riesgo de muerte en el año siguiente es de entre el 15 y el 20%. Por último, factores como la edad avanzada, la esteatosis hepática, el género masculino, la presencia de ciertos polimorfismos genéticos, el alcoholismo, la obesidad, la resistencia a la insulina,

la coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) o el VIH, o la terapia inmunosupresora, han sido asociados con un incremento del riesgo de progresión hepática (87,88).

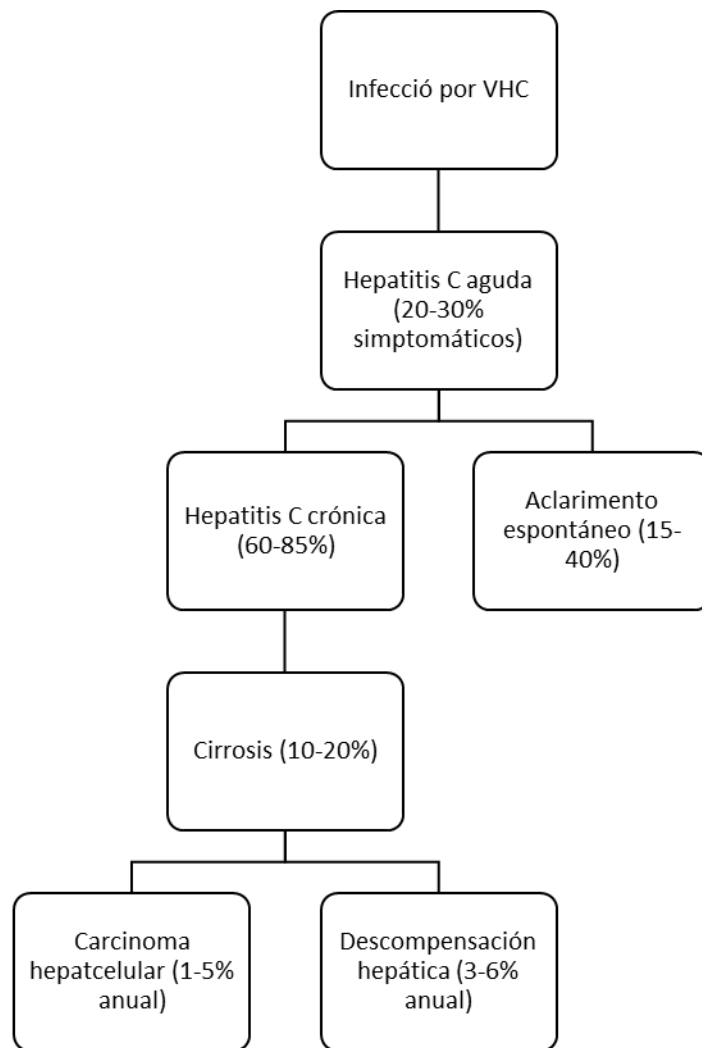


Figura 9. Historia natural de la hepatitis C. Fuente: S. Lingala *et al.*, 2015 (87).

1.2.2. Situación epidemiológica de la hepatitis C y estrategias de eliminación como problema de salud pública

La preocupación de las instituciones sanitarias por las hepatitis virales como problema de salud pública ha aumentado de manera notoria en las últimas décadas. En 2013, el estudio *Global Burden of Disease* ponía de manifiesto la mortalidad asociada al fracaso hepático agudo, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular secundario a las hepatitis virales. Globalmente, las hepatitis virales causaban más de 1 millón de muertes al año, superior a la mortalidad asociada al VIH, la tuberculosis o la malaria (89). Además, se estimaba que esta brecha puede agrandarse en el futuro. Un estudio afirmaba que para el 2040 las muertes por hepatitis crónica (mayoritariamente por hepatitis C y B) superarían a las asociadas al VIH, la tuberculosis y la malaria juntas (90).

En mayo del 2016, los Estados Miembros de la OMS aprobaron la primera **Estrategia Mundial del Sector de la Salud frente a las hepatitis víricas** en la 69ª **Asamblea General de Salud** (91). Esta estrategia hacía un llamamiento a la eliminación de las hepatitis víricas como amenaza para la salud pública para el 2030, con el objetivo de **reducir la mortalidad** (un 10% en 2020 y un 65% en 2030) y **la incidencia de nuevas infecciones** (un 30% en 2020 y un 90% en 2030). Asimismo, destacaba la necesidad de mejora con medidas de actuación específicas en diferentes puntos del proceso sanitario como en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. En cuanto a la **prevención**, se instaba a mejorar la seguridad en las inyecciones, transfusiones de sangre y cirugías en los entornos sanitarios como una de las principales medidas para la reducción de la transmisión del VHC, especialmente en los países de rentas bajas y

medias. También destacaba la necesidad de implementar estrategias de **reducción de daños** para asegurar el acceso a material estéril de inyección (jeringuillas, agujas, y resto de parafernalia) y el **tratamiento efectivo de la drogodependencia** como medidas clave para la reducción de la transmisión del VHC, así como de **métodos de diagnóstico simplificados** en un escenario en el que solo el 20% de los pacientes con hepatitis C crónica estaban diagnosticados en 2015, con el objetivo de llegar al 90% de personas diagnosticadas y entre estas, el 80% de personas tratadas en 2030. De igual manera, exponía la necesidad de crear circuitos sanitarios dirigidos a **prevenir las pérdidas en el seguimiento** de la enfermedad así como incrementar las tasas de tratamiento (66,91) (**Figura 10**).

En 2017, la OMS avaló el primer **Plan de Acción para las Hepatitis Víricas en la Región Europea**, que adaptaba la estrategia mundial al contexto de esta región. El plan proponía siete objetivos regionales para 2020 (92);

1. Cobertura del 95% de personas con tres dosis de la vacuna contra el VHB en los países que aplican la vacunación infantil universal;
2. 90% de cobertura en intervenciones para prevenir la transmisión del VHB de madre a hijo (vacunación de la hepatitis B al nacer u otros enfoques);
3. 100% de cribado para el VHC y el VHB en las donaciones de sangre con métodos de calidad garantizada;
4. 50% de las inyecciones administradas con dispositivos de inyección de seguridad, integrado en un sistema de prevención y control de infecciones;

5. Distribución de al menos 200 kits de material de inyección estéril por persona y año para PQID, como parte de un paquete integral de servicios de reducción de daños;
6. Una tasa de diagnóstico del 50% entre las personas que viven con infección crónica por el VHC o el VHC;
7. 75% de cobertura para las personas elegibles para el tratamiento y diagnosticadas con infecciones por el VHB y el VHC.

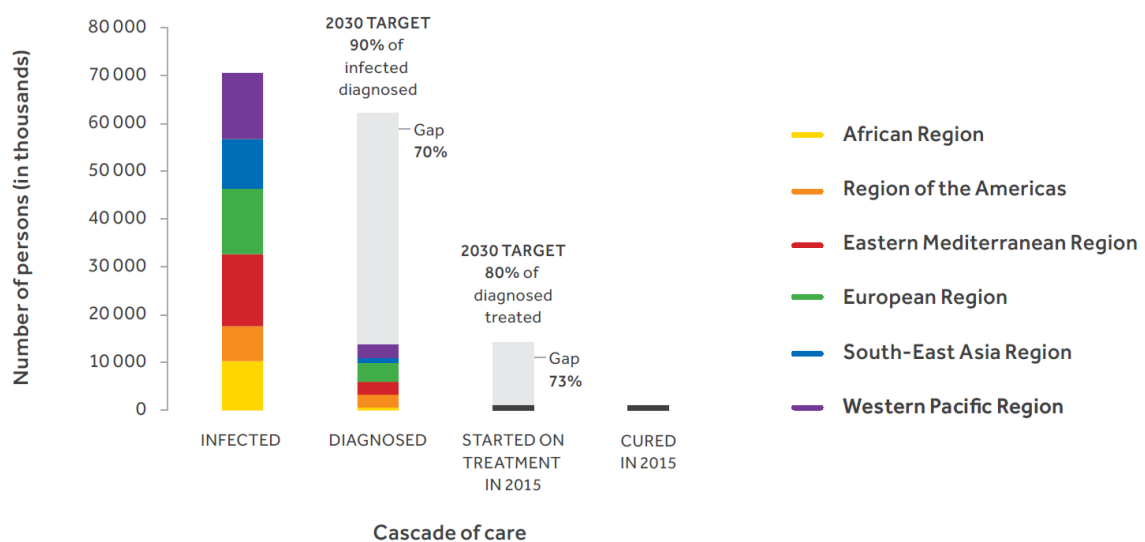


Figura 10. Cascada de cuidados del VHC por diferentes regiones de la OMS y objetivos marcados por el plan de la OMS para la eliminación del VHC. Fuente: Global hepatitis report, 2017 (66).

En mayo del 2021 la OMS ha publicado un informe sobre el progreso global de eliminación del VIH, las hepatitis víricas y las infecciones de transmisión sexual, en el que destaca los avances realizados en el campo de la hepatitis C. En 2019, un total de

124 países habían desarrollado planes de acción nacionales o estaban en desarrollo, frente a 15 en 2016. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosas intervenciones en las respuesta a las hepatitis víricas basadas en modelos innovadores de prestación de servicios (93). La aparición de nuevos AAD, con unas tasas de respuesta viral sostenida (RVS) superiores al 90% han supuesto una revolución en el tratamiento y la consecuente reducción de la mortalidad asociada a la hepatitis C a nivel global. En 2019, 9,4 millones de personas se habían tratado con estos antivirales. No obstante, este número sigue estando lejos del objetivo de 40 millones de personas tratadas para 2030. Además, solo el 21% de las personas con hepatitis C son conscientes de su estado (**Figura 11**). Por ello, el informe la OMS hace un llamamiento a seguir escalando el diagnóstico y el tratamiento de la hepatitis C, en especial en las poblaciones más vulnerables, como las PQID. El informe pone de manifiesto que el acceso a los servicios de prevención, reducción de daños y atención sanitaria para estas poblaciones es en gran medida insuficiente, y la persistencia del estigma, las desigualdades, la criminalización y otras barreras socio-estructurales impiden que los planes diseñados para la eliminación de la hepatitis C lleguen a las personas que más los necesitan en muchos países (81).

Un nuevo documento publicado por la OMS en Junio del 2021 ha propuesto el uso de **indicadores de impacto absoluto** para validar la eliminación a nivel nacional en lugar de los objetivos de reducción relativa definidos originalmente en el plan de 2016, como una incidencia anual $<5/100.000$ personas o $<2/100$ en PQID, o una tasa de mortalidad anual $<2/100.000$ personas (82).

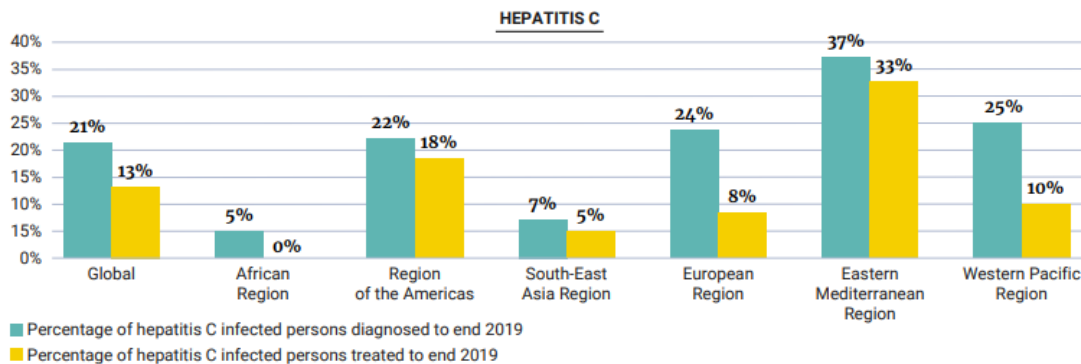


Figura 11. Porcentaje de personas diagnosticadas y tratadas de hepatitis C en las diferentes regiones de la OMS en 2019. Fuente: Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021 (81).

Paralelamente al plan de la OMS, en 2015 se elaboró en España el **Plan Estratégico para el abordaje de la Hepatitis C (PEAHC)** como respuesta a la problemática de la hepatitis C en nuestro país (94). El Plan se estructuraba en 4 líneas estratégicas; la cuantificación del problema, la definición de los criterios científico-clínicos para establecer una estrategia terapéutica, los mecanismos de coordinación para su implementación en el Sistema Nacional de Salud, y el fomento del avance en el conocimiento de la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad a través de actuaciones específicas en el área de la I+D+i. El PEAHC enfatizaba la escasez de información válida y actualizada sobre la situación de la hepatitis C en España a partir de la que poder desarrollar e implantar un sistema de información válido, evaluable y de amplia cobertura territorial. Además, dada la ausencia de una vacuna para la hepatitis C, se resalta la relevancia de programas de prevención y diagnóstico,

principalmente en los grupos de alto riesgo, como los HSH con prácticas sexuales de riesgo y las PQID, coincidiendo con las recomendaciones marcadas por la OMS.

En este contexto, un estudio publicado en 2017 calculaba que el 53% de los individuos infectados por el VHC en España no habían sido aún diagnosticados (95), y un segundo trabajo estimaba que de seguir con las tasas de diagnóstico reportadas, se alcanzaría un estado de “agotamiento diagnóstico” en 2022, en la que no quedarían más individuos por tratar si no se ampliaban los esfuerzos para detectar los casos ocultos (96). De acuerdo con el **Observatorio Polaris**, en aquel momento la estrategia española estaba lejos de promover la detección de nuevos diagnósticos requeridos por la OMS, especialmente necesario en las poblaciones más vulnerables (97).

No obstante, gracias al PEAHC, a fecha de 1 de Octubre de 2019 se habrían tratado más de 135.000 de los 472.000 pacientes con hepatitis C crónica en España, según los cálculos del plan en 2015 (94,98). Sin embargo, la estimación realizada por el último estudio nacional de prevalencia sobre el número de individuos con anticuerpos e infección virémica por VHC era considerablemente inferior a las reflejadas por el PEAHC (1,7% vs 0,85% en anti-VHC y 0,22% vs 1,22% en RNA-VHC en población adulta), por lo que el número de individuos infectados que quedan por tratar podría ser más bajo que el considerado inicialmente. Además, el mismo estudio destaca el porcentaje de individuos sin diagnosticar. La proporción de individuos que acudían a atención primaria y que no era consciente del estado propio de anti-VHC y RNA-VHC fue del 14,3% y 29,4%, respectivamente (83).

A nivel regional, en 2017 se diseñó el **Plan de prevención y control de la hepatitis C en Cataluña**, editado de nuevo en 2018 y aprobado finalmente en 2019, en el cual el Departamento de Salud reconocía el diagnóstico precoz como un beneficio tanto desde un punto individual como de salud pública, al reducir la transmisión del virus. Al igual que en la estrategia de la OMS, este identificaba la necesidad de mejorar el acceso al diagnóstico en aquellas poblaciones que presentan mayor riesgo de infección y ponía énfasis en el cribado comunitario de estos colectivos, como los migrantes de países endémicos, las PQID o los HSH (99). A raíz de este plan, del 2015 al 2020 se habrían tratado 25.839 personas con hepatitis C crónica en Cataluña (100). También cabe destacar la implementación de acciones específicas para aumentar las tasas de diagnóstico, tratamiento y vinculación a la atención sanitaria, como la formación de médicos de familia referentes en el manejo de la hepatitis C en el ámbito de la atención primaria o el tratamiento del 42% de las PQID diagnosticadas por VHC en programas de mantenimiento de metadona (a fecha de 2019) (101). No obstante, la prescripción de antivirales ha disminuido estos últimos años (de 5.974 en 2015 a 1.727 en 2020) (102), por lo que será necesario reforzar y diseñar estrategias de cribado capaces de detectar los casos no diagnosticados, como se ha comentado anteriormente.

1.2.3. Impacto de la COVID-19 en la eliminación de la hepatitis C

En marzo de 2020 la OMS declaró la situación de pandemia debido a la expansión del *severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2)*, agente etiológico de la enfermedad por coronavirus 2019 (**COVID-19**) (103).

La COVID-19 ha dado lugar a una respuesta mundial sin precedentes y ha supuesto un importante desgaste en los sistemas sanitarios a nivel global, siendo necesaria una importante reasignación de los recursos y personal sanitarios en detrimento de otras enfermedades (104).

En este contexto, un trabajo basado en modelaje matemático publicado a mitades del 2020 alertaba sobre las graves consecuencias a largo plazo de interrumpir durante un año el diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C, lo que supondría un exceso de 623.000 infecciones virémicas para 2030 a nivel global, así como 44.800 casos más de carcinoma hepatocelular y 72.300 muertes asociadas más (104). El exceso de casos de cáncer y muertes se daría especialmente en países de renta alta (104). En otra publicación inglesa, se estimó que durante el 2020 habían incrementado un 17% el número de casos de enfermedad hepática avanzada por el VHC y un 7% el número de muertes asociadas a la hepatitis C (105).

En España, durante la pandemia causada por la COVID-19 se ha producido un descenso en el número de pruebas diagnósticas realizadas del VHC, y se ha visto afectado la vinculación al sistema sanitario, los programas de reducción de daños y los programas de micro-eliminación (106). En el ámbito de los servicios de reducción de riesgos en Cataluña, durante el periodo de pandemia en 2020 se atendieron un 27% menos

usuarios de media al día (de 300 a 70). Además, ningún paciente inició tratamiento para la hepatitis C, y el 28% ($n=34$) no acudieron a las visitas de seguimiento (107).

Por todo ello, ahora más que nunca, será necesario potenciar los programas de prevención, cribado y tratamiento para poder alcanzar los objetivos de eliminación (108).

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C

1.3.1. Diagnóstico serológico y virológico de la hepatitis C

El diagnóstico de la hepatitis C se ha basado tradicionalmente en la combinación de dos pruebas: una prueba serológica que informa sobre la exposición previa del VHC seguida de la detección directa del virus en suero/plasma para confirmar la infección virémica (ya sea a través de técnicas moleculares de PCR como de detección del antígeno core del VHC) (109).

En la práctica clínica habitual de los laboratorios especializados, el primer paso para el diagnóstico del VHC se basa en la detección de los anti-VHC a través de técnicas inmunoenzimáticas comerciales (EIA, *enzyme immunoassays*). Con el desarrollo de los EIAs de tercera generación es posible detectar los anti-VHC entre cuatro y seis semanas después de la infección con una sensibilidad de más del 99% (110). La especificidad es difícil de definir debido a la falta de un apropiado *gold standard*. No obstante, pueden aparecer falsos positivos en pacientes con enfermedades autoinmunes; se han observado reacciones cruzadas con el factor reumatoide. Por otro lado, los falsos negativos pueden encontrarse en pacientes con inmunodepresión

severa (como en la infección avanzada por VIH o los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido), en hemodiálisis o en el periodo ventana de los anti-VHC, que dura aproximadamente dos meses (111).

La posterior confirmación de la infección virémica por el VHC se basa en la detección de su genoma. Además, la detección del genoma es necesaria para la evaluación de la respuesta al tratamiento frente al VHC, el diagnóstico de la infección aguda durante el periodo ventana serológico, o en aquellos individuos, que, como se ha comentado en el anterior apartado, tienen un sistema inmune comprometido y pueden dar falsos negativos en la prueba de anticuerpos. Las primeras plataformas automatizadas capaces de detectar el RNA-VHC se basaban en ensayos cualitativos, mucho más sensibles que las técnicas cuantitativas en sus inicios. La necesidad de aumentar la sensibilidad de detección del RNA-VHC, de determinar la carga viral durante el tratamiento del VHC así como de evaluar su eficacia, dio paso a la expansión de los ensayos cuantitativos, ampliamente utilizados hoy en día en la gran mayoría de laboratorios de referencia. Desde su salida al mercado, se han comercializado múltiples ensayos basados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. El Cobas AmpliCor™ HCV 2.0 Monitor (Roche Diagnostics) está basado en una **PCR competitiva**, mientras que el ensayo Versant™ HCV RNA Assay (Siemens Healthcare Diagnostics) se basa en una **hibridación molecular con amplificación de la señal** (*branched DNA*). Más recientemente, se han introducido los ensayos Cobas® TaqMan® HCV Test v2.0 (Roche Diagnostics) y Abbott RealTime™ HCV test (Abbott Diagnostics), ambos basados en la **PCR a tiempo real**. Su límite inferior de detección (LID), así como la linealidad y el

amplio margen de detección de las cargas virales supusieron una ventaja frente a las técnicas cualitativas y cuantitativas diseñadas anteriormente. Más recientemente, se ha aprobado un nuevo ensayo basado en la **amplificación mediada por transcripción (TMA)**, el ensayo Aptima HCV Quant Dx (Hologic), que permite la detección cualitativa y cuantificación del RNA-VHC y que ha mostrado una elevada concordancia con los ensayos basados en la PCR a tiempo real (112).

La incorporación de algoritmos *reflex*, denominado diagnóstico en un solo paso, ha sido incorporada en varios países, demostrando mejorar la vinculación a la asistencia y el tratamiento (113). En esta, una muestra en la cual se detectan los anti-VHC es redirigida de manera refleja para la detección del RNA-VHC sin necesidad de realizar una segunda venopunción, acortando el número de visitas necesarias para alcanzar un diagnóstico confirmado. En España, el algoritmo *reflex* ha sido avalado por la guía de cribado de la infección por el VHC (114), y desde 2019 el 80% de los laboratorios en centros hospitalarios españoles lo han incorporado en su rutina (115).

La detección del antígeno Core del VHC (Ag Core) constituye una técnica alternativa para la detección directa del virus. El ensayo detecta la partícula p22 de la nucleocápside del VHC liberada por las células infectadas, siendo un marcador subrogado de su replicación (116,117). En un meta-análisis reciente, la detección del Ag Core mostró una sensibilidad y especificidad en comparación con la PCR en tiempo real del 93 y el 98%, respectivamente (118). Además, en un estudio francés realizado en Camerún se demostró la fiabilidad del Ag Core en pacientes con coinfección por el VHB y el VIH (119). La cuantificación del Ag Core es posible a través del ensayo *Abbott*

Ag Core assay (Abbott Diagnostics), mostrando una buena correlación con las cargas virales por encima de 3.000 UI/mL. El LID del ensayo se encuentra entre 500 y 3.000 UI/mL, en función del genotipo, lo que permite detectar la mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica (116). No obstante, se debe tener en cuenta la falta de datos de sensibilidad/especificidad para los genotipos 4, 5 y 6 (118), además de los posibles falsos negativos en pacientes infectados por el genotipo 3, en el que se han detectado polimorfismos que alteran la detección del Ag Core (120).

Una de las mayores ventajas de la determinación de Ag Core es el precio, considerablemente más bajo que las técnicas moleculares de detección del RNA-VHC (121). No obstante, el ensayo más utilizado es el comercializado por *Abbott Diagnostics* a través de la plataforma *Architect*, lo que requiere de un laboratorio centralizado para su realización. En este sentido, el desarrollo de pruebas PoCT para el Ag Core supondrá un beneficio cuanto a la implementación de esta técnica en escenarios donde el acceso a un laboratorio no sea posible (121). A finales de 2018 la organización de salud global sin ánimo de lucro FIND anunció la concesión de ayudas para el desarrollo, la fabricación y la validación de dos prototipos de PoCT para la detección del Ag Core por parte de las empresas Qorvo Biotechnologies y Novel Biomarkers Catalyst Lab, aunque en el momento de redacción de la presente tesis no se disponían de resultados preliminares (122).

1.3.2. Diagnóstico de la infección aguda de la hepatitis C

El diagnóstico de la infección aguda tiene implicaciones tanto a nivel individual como colectivo. En grupos vulnerables como las PQID el diagnóstico precoz del VHC promueve la vinculación al sistema sanitario, asesoramiento en prácticas de riesgo para evitar la reinfección e intervenciones para la reducción de la progresión de la enfermedad hepática. Asimismo, estudios recientes demuestran que el tratamiento con AAD es altamente efectivo en la fase aguda de la infección. A nivel colectivo la identificación de la infección aguda es fundamental para prevenir la transmisión entre individuos y de esta manera la propagación de la infección, especialmente en poblaciones con factores de riesgo para el VHC y alta incidencia de la enfermedad (como en las PQID) (123,124). En consecuencia, las principales guías internacionales recomiendan el tratamiento de la infección aguda en aquellos individuos donde el seguimiento del aclaramiento espontáneo no se pueda llevar a cabo, con el fin de evitar la transmisión del virus (125,126).

Actualmente, su diagnóstico microbiológico se basa en: 1) la detección del RNA-VHC durante al periodo ventana seronegativo, o 2) la evidencia de una seroconversión después de un resultado reciente negativo (123,127). En estos casos, se puede sospechar de una hepatitis C aguda si los signos y síntomas clínicos son compatibles con una hepatitis aguda (nivel de alanina aminotransferasa >10 veces el límite superior de la normalidad y/o ictericia), en ausencia de antecedentes de enfermedad hepática crónica u otras causas de hepatitis aguda, y/o si se puede identificar una fuente de transmisión reciente (128). No obstante, el diagnóstico de la infección aguda por VHC

es complicado debido a múltiples factores; el corto período ventana de los anti-VHC (dos meses aproximadamente después de la transmisión), la ausencia de síntomas en la mayoría de los casos, así como la ausencia de marcadores serológicos específicos para su identificación. En este sentido, V. Montoya *et al.* demostraron que la diversidad intra-hospedador de la región NS5B del VHC, determinada por el valor del estimador de diversidad genética ES estimada mediante NGS, aumenta proporcionalmente con el tiempo de infección, y en consecuencia, tiene el potencial de diferenciar las infecciones agudas (menor diversidad) de las crónicas (mayor diversidad) a nivel poblacional incluso después de la seroconversión, pudiéndose utilizar como método alternativo para identificar las infecciones agudas (129,130). No obstante, para su utilización a nivel poblacional era necesario establecer un punto de corte del valor de ES que permitiera diferenciar las infecciones agudas de las crónicas, por lo que fue uno de los objetivos principales del **Artículo III** de la presente tesis doctoral. Además, en el **Artículo III** también valoramos nuevas aplicaciones de este estimador, como su utilidad para calcular la incidencia en estudios transversales y para identificar los determinantes de infección aguda entre PQID que acuden a CRD, dos herramientas valiosas para hacer frente a la epidemia en la población de estudio.

1.3.3. Tratamiento farmacológico de la hepatitis C

El objetivo principal de la terapia contra el VHC es curar la infección para prevenir la cirrosis, su descompensación, el cáncer de hígado y aumentar la supervivencia. El mejor indicador del efecto beneficioso y curativo del tratamiento es la respuesta

virológica sostenida (RVS), que se define como la negativización de los niveles de RNA-VHC en plasma a las 12 semanas después de terminar el tratamiento. Después de la RVS las recidivas tardías son muy poco frecuentes (0,2% de todos los casos de recidiva después del tratamiento). La RVS mejora el pronóstico de los pacientes con fibrosis avanzada por el VHC, reduciendo significativamente la probabilidad de descompensación de la enfermedad hepática, la incidencia de carcinoma hepatocelular, y la necesidad de trasplante. Además, disminuye la mortalidad de causa hepática y la mortalidad por cualquier otra causa (128).

La evaluación pretratamiento incluye la valoración de la fibrosis hepática, que es necesaria para identificar a los pacientes con fibrosis avanzada, los cuales requerirán seguimiento a largo plazo. Por otro lado, la identificación del genotipo antes de iniciar el tratamiento permite optimizar el tratamiento antiviral y es relevante a nivel epidemiológico (126,128).

El primer tratamiento frente a la hepatitis C fue el IFN- α , aprobado por primera vez en 1991 como monoterapia. Posteriormente, la adición de la ribavirina, y más tarde la administración combinada de IFN- α pegilado con ribavirina aumentó notablemente las tasas de RVS hasta alcanzar aproximada un 60% (**Figura 12**) (desde el 16% con IFN- α en monoterapia), aunque eran tratamientos largos (entre 6 y 18 meses) y con frecuentes efectos adversos. Diferentes factores virológicos y del hospedador se asociaron a la RVS con las terapias basadas en el IFN- α , como la edad joven, el sexo femenino, la herencia no afroamericana, los niveles bajos de fibrosis, los genotipos 2 y 3, los niveles

bajos de carga vírica o la presencia de polimorfismos específicos cerca del gen de la interleucina 28B, que codifica para el interferón $\lambda 3$ (131).

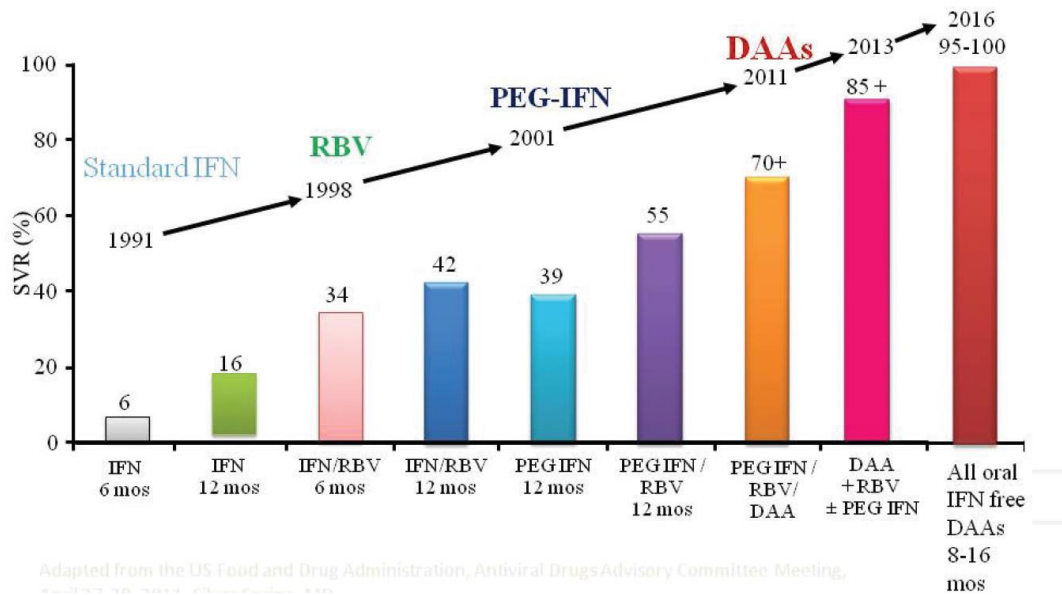


Figura 12. Evolución de la respuesta viral sostenida de las diferentes combinaciones de fármacos contra la hepatitis C. Fuente: S.M. Kamal, 2017 (132).

El conocimiento del ciclo de replicación del VHC ha permitido identificar nuevas dianas terapéuticas, tales como inhibidores de la proteasa NS3-4A, inhibidores de la polimerasa NS5B e inhibidores de la NS5A. En 2011 se aprobaron los primeros AAD (telaprevir y boceprevir), ambos inhibidores de la proteasa NS3-4A, en combinación con el IFN- α pegilado y la ribavirina. Posteriormente se comercializaron AAD con actividad inhibidora de la RNA polimerasa RNA-dependiente NS5B (sofosbuvir, dasabuvir), inhibidores de la NS5A (daclatasvir, elbasvir, ledipasvir, ombitasvir, pibrentasvir, velpatasvir) y nuevas generaciones de inhibidores de la proteasa NS3-4A

(glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir, simeprevir, voxilaprevir), con un perfil de seguridad y eficacia más elevados, permitiendo alcanzar tasas de RVS superiores al 95% (131) **(Figura 13)**. Finalmente, la aparición de combinaciones de fármacos pangenotípicos ha supuesto simplificar el tratamiento, haciendo posible adaptar la terapia a diferentes colectivos, especialmente los más vulnerables y aquellos que presenta diferentes barreras para la vinculación al sistema sanitario (PID, HSH, migrantes, personas sin hogar o personas internas en centros penitenciarios), permitiendo un enfoque centrado en el paciente.

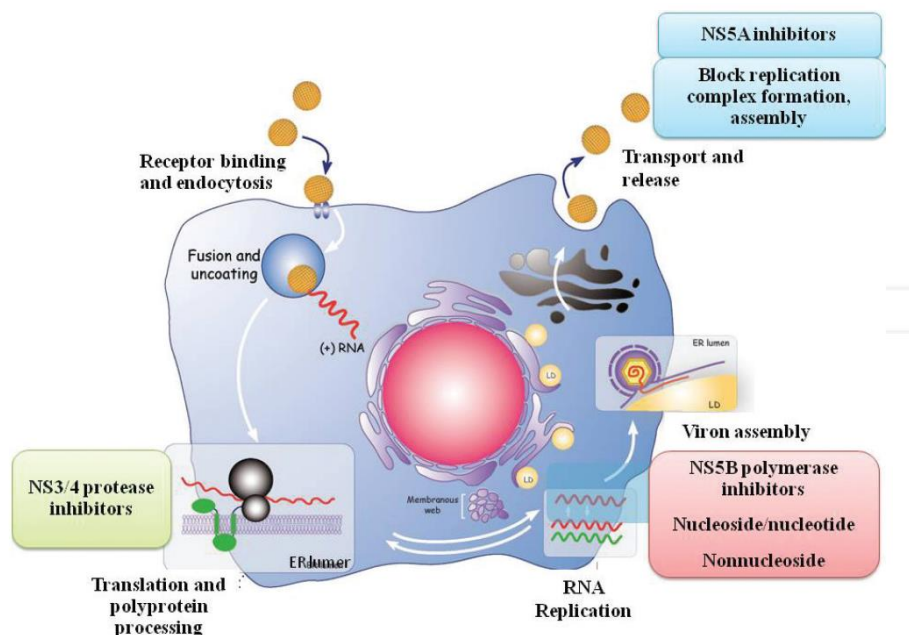


Figura 13. Ciclo celular del virus de la hepatitis C y dianas de los antivirales de acción directa. Fuente: S.M. Kamal, 2017 (132).

La aparición de los AAD también cambió el paradigma del abordaje de la hepatitis C: el tratamiento de la infección y no de la lesión hepática, permitiendo enfocar el problema desde un punto de vista de salud pública. En el colectivo de las PQID, antes de la aparición de los antivirales específicos existía la idea ampliamente aceptada de que las PQID debían haber estado sin consumir droga o en terapia de sustitución durante al menos 6-12 meses, por lo que no existía una recomendación general para el tratamiento de las PQID activas, y se recomendaba un enfoque individualizado después de la evaluación y seguimiento estrecho por un experimentado multidisciplinario (133). En 2015 las guías de la Sociedad Europea para el Estudio del Hígado (EASL) sitúan por primera a las PQID como un grupo prioritario para el tratamiento frente a la hepatitis C (134), con el objetivo de utilizar el tratamiento no sólo a nivel individual, sino como herramienta de salud pública para cortar la transmisión del virus, recomendación que fue adoptada el mismo año por el documento de consenso del Grupo de Estudio de las Hepatitis Víricas (GEHEP) sobre el tratamiento de la hepatitis C (135).

1.3.4. Genotipado del VHC

Antes de la aparición de los AAD, el genotipo era un factor predictivo de la respuesta a la terapia basada en el IFN- α , y debía ser determinado para la elección de la pauta terapéutica más adecuada de los primeros regímenes de AAD (136). La identificación del genotipo sigue teniendo relevancia en la era de los nuevos AAD pan-genotípicos, tanto para optimizar el tratamiento como a nivel epidemiológico (126,128). No

obstante, las últimas guías internacionales proponen un tratamiento simplificado con AAD pan-genotípicos, que pueden utilizarse sin la necesidad de determinar el genotipo y subtipo del VHC previamente (**Figura 14**) (128).

Type of treatment	Genotype	Cirrhosis status	Prior treatment experience	Sofosbuvir/velpatasvir	Glecaprevir/pibrentasvir	Sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir	Grazoprevir/elbasvir
Simplified treatment, no genotype/subtype determination ^a	All genotypes	No cirrhosis	Treatment-naïve	12 weeks	8 weeks	No	No
			Treatment-experienced				
		Compensated (Child-Pugh A) cirrhosis	Treatment-naïve		12 weeks		
			Treatment-experienced				

Figura 14. Recomendaciones para el tratamiento simplificado, sin genotipado/subtipado del VHC, de los pacientes ≥ 12 años infectados por el VHC o con coinfección por VHC/VIH con hepatitis C crónica sin cirrosis o con cirrosis compensada (Child-Pugh A), incluidos los pacientes sin tratamiento previo y los pacientes con tratamiento previo con IFN- α pegilado y ribavirina; IFN- α pegilado, ribavirina y sofosbuvir; o sofosbuvir y ribavirina). Fuente: EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020 (128).

No obstante, la identificación del genotipo/subtipo sigue siendo útil y puede ser necesario antes de iniciar algún régimen de AAD específico de genotipo en situaciones donde no se disponga de AAD pan-genotípicos, o para optimizar los regímenes de tratamiento con AAD pan-genotípicos (**Figura 15**) (128).

Type of treatment	Genotype	Cirrhosis status	Prior treatment experience	Sofosbuvir/ velpatasvir	Glecaprevir/ pibrentasvir	Sofosbuvir/ velpatasvir/ voxilaprevir	Grazoprevir/ elbasvir	
Genotype/subtype determination-based treatment	Genotype 1a, 1b, 2, 4, 5 and 6	No cirrhosis	Treatment-naïve	12 weeks	8 weeks	No	12 weeks (genotype 1b only)	
			Treatment-experienced					
		Compensated (Child-Pugh A) cirrhosis	Treatment-naïve		12 weeks			
			Treatment-experienced		12 weeks			
	Genotype 3	No cirrhosis	Treatment-naïve	12 weeks	8 weeks	No	No	
			Treatment-experienced	12 weeks	12 weeks		No	
		Compensated (Child-Pugh A) cirrhosis	Treatment-naïve	12 weeks with weight-based ribavirin ^a	8-12 weeks ^b		12 weeks ^c	No
			Treatment-experienced	12 weeks with weight-based ribavirin ^a	16 weeks		12 weeks ^c	No
	Subtype 1l, 4r, 3b, 3g, 6u, 6v or any other subtype naturally harbouring one or several NS5A RAS ^c	No cirrhosis	Treatment-naïve	Unknown	Unknown	12 weeks	No	
			Treatment-experienced					
		Compensated (Child-Pugh A) cirrhosis	Treatment-naïve					
			Treatment-experienced					

Figura 15. Recomendaciones para el tratamiento basado en el genotipo/subtipo del VHC, de los pacientes ≥ 12 años infectados por el VHC o con coinfección por VHC/VIH con hepatitis C crónica sin cirrosis o con cirrosis compensada (Child-Pugh A), incluidos los pacientes sin tratamiento previo y los pacientes con tratamiento previo con IFN- α pegilado y ribavirina; IFN- α pegilado, ribavirina y sofosbuvir; o sofosbuvir y ribavirina). Fuente: EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2020 (128).

Además, se recomienda determinar el genotipo y el subtipo del VHC en algunas regiones de África y Asia y en los migrantes de estas regiones en las que se han observado una alta prevalencia de ciertos subtipos (p.e. los subtipos 1l, 4r, 3b, 3g, 6u o 6v) que presentan polimorfismos que confieren resistencia intrínseca a los inhibidores de la NS5A, lo que da lugar a tasas inaceptables de fracaso terapéutico (128).

El método de referencia para el genotipado comprende la secuenciación Sanger seguido del análisis filogenético de amplicones de las regiones NS5B o core/E1. No obstante, su complejidad técnica y laboriosidad no está al alcance de todos los laboratorios (24,25). En la última década se han comercializado una considerable cantidad de ensayos que permiten la automatización y procesamiento de las muestras,

basados en tecnologías de **PCR a tiempo real** o de **hibridación reversa** con sondas específicas que detectan las regiones 5'UTR y además la NS5B y/o core del virus. El *HCV Genotype II assay* de Abbott utiliza una PCR a tiempo real con sondas específicas marcadas con diferentes fluorocromos para la región 5'UTR para el genotipado y la NS5B para asignar los subtipos 1a/1b. Esta técnica ha demostrado una fiabilidad excelente para determinar los genotipos/subtipos, aunque con un porcentaje de 5-12% de muestras no subtipadas del genotipo 1 (137–140) y una tasa resultados indeterminados del 8% en muestras con genotipo 3, según un estudio realizado en el Hospital Germans Trias i Pujol (139). Además, algunos estudios han observado que la determinación del genotipo puede fallar en el genotipo 6, en el que en ocasiones se asigna como genotipo 1 sin subtipar, lo que constituye un problema en regiones como el Sud-este Asiático, donde este genotipo es altamente prevalente (140).

Recientemente, Abbott ha desarrollado el *VHC Genotype Plus RUO assay* basado en la PCR a tiempo real de la región core para la confirmación de los subtipos 1a/1b y genotipo 6 en aquellas muestras con subtipo 1 indeterminado por el ensayo anterior (138). En un estudio realizado por nuestro grupo con muestras de pacientes tratados en el Hospital Germans Trias i Pujol, el ensayo *HCV Genotype Plus RUO* (Abbott) fue capaz de asignar el subtipo (1a o 1b) en el 88,8% de los casos en los que el ensayo *HCV Genotype II* (Abbott) no había sido capaz de subtipar. Además, la concordancia global del ensayo *HCV Genotype Plus RUO* en comparación con la secuenciación Sanger o el ensayo de hibridación reversa LiPA fue del 98,6%, consiguiendo reducir

considerablemente el porcentaje de muestras con genotipo 1 sin subtipar, y por lo tanto, la necesidad de realizar el método de referencia (secuenciación Sanger) (141).

Otros dos ensayos ampliamente utilizados en los laboratorios son el *Versant® VHC Genotype 2.0 System* (LiPA) de Siemens, basado en la hibridación reversa y el *Cobas® VHC genotyping test* de Roche (PCR a tiempo real), que utilizan las regiones 5'UTR/core y 5'UTR/core/NS5B, respectivamente, para el genotipado y la caracterización de los subtipos más frecuentes del virus. Ambos ensayos han sido validados con buenos resultados, aunque de manera similar al ensayo de Abbott, con algunos problemas para identificar el genotipo 6 (142).

Por último, la aparición de las nuevas tecnologías de NGS supone un avance en la capacidad de caracterizar los genotipos y subtipos, especialmente de identificar posibles infecciones mixtas donde uno de ellos es minoritario y no se detecta por secuenciación Sanger o los ensayos basados en sondas, así como para identificar variantes minoritarias asociadas a resistencia al tratamiento. Las tecnologías basadas en NGS también han permitido generar genomas completos de una manera mucho más rápida que la secuenciación Sanger, facilitando así la caracterización de nuevos genotipos/subtipos o formas recombinantes (143). No obstante, aunque las técnicas de NGS tienen un gran potencial en este sentido, la falta de estandarización a nivel experimental y la complejidad del análisis de los datos constituyen los principales inconvenientes de esta tecnología (144). La comercialización de plataformas automatizadas como *Sentosa SQ VHC Genotyping Assay* (VELA Diagnostics GmbH), que

utiliza la NGS para el genotipado y la detección de resistencias asociada a los AAD, será determinante para su implementación en los laboratorios clínicos (145).

1.3.5. Muestras alternativas para el diagnóstico del VHC y *point-of-care* testing (PoCT)

La hepatitis C cursa de manera asintomática en la mayoría de los casos hasta el desarrollo de enfermedad hepática avanzada, antes de la cual muchas personas no son conscientes de su estado. Además, la complejidad del algoritmo diagnóstico convencional (basado en la serología, y si positiva, detección del RNA-VHC) y de las técnicas disponibles, que requieren de un laboratorio especializado, dificultan el diagnóstico del VHC, especialmente para poblaciones vulnerables con acceso limitado al sistema sanitario (121). Consecuentemente, las tasas de diagnóstico en la población general siguen siendo bajas, incluso en países de renta alta (81). En este sentido, las guías de diagnóstico elaboradas por la OMS fomentan el uso de algoritmos y test diagnósticos alternativos en escenarios donde los recursos sean limitados o en grupos poblacionales denominados de difícil acceso por su menor acceso al sistema sanitario formal, con el fin de llegar al 90% de casos diagnosticados para el 2030 (91,109).

Entre las pruebas alternativas se encuentran los test de diagnóstico rápido (**Rapid diagnostic tests, RDTs**) en forma de inmuno-cromatografías para la detección de los anti-VHC en muestra de sangre capilar o fluido oral que permiten la lectura de los resultados en 15-20 minutos. A diferencia de los EIAs realizados en los laboratorios de referencia, estas técnicas no requieren de equipos sofisticados, ni de un

procesamiento especial de las muestras (centrifugación o conservación en frío) o personal cualificado, además de tener un coste reducido. Su uso como PoCT permite la descentralización de la detección de anti-VHC en escenarios donde los recursos son limitados, o en colectivos donde las técnicas de referencia no sean practicables. En las PQID, por ejemplo, la obtención de muestras alternativas como la sangre capilar obtenida a partir de punción dactilar o el fluido oral son una gran ventaja debido al difícil acceso venoso que suelen presentar estos individuos, donde la obtención de sangre por flebotomía puede constituir una barrera para el diagnóstico (146). Asimismo, en los últimos años han surgido diferentes RDTs con valores excelentes de sensibilidad y especificidad respecto a los EIAs (147–150). Por otra parte, algunos estudios llevados a cabo con estas técnicas rápidas en condiciones de vida real han expuesto peores resultados de sensibilidad y especificidad, por lo que el riesgo/beneficio de su implementación se tienen que valorar en cada situación (121).

Igualmente, la detección del RNA-VHC a través de ensayos PoCT tiene un gran potencial en la mejora del acceso al diagnóstico de la infección virémica por el VHC, aunque en este caso no hablamos de RDT porque los resultados no se obtienen de forma tan rápida. Estos ensayos integran la extracción de los ácidos nucleicos, la retro-transcripción, la amplificación y la detección permitiendo el diagnóstico *in situ* del VHC (149). No obstante, al contrario que los RDTs de detección de anticuerpos, el mercado de los PoCT para la detección del RNA-VHC es reducido, dificultando así la disponibilidad de una alternativa económica a los ensayos actuales. Entre estos se encuentra el ensayo PoCT *Xpert HCV Viral Load* manufacturado por *Cepheid*, el cual

requiere de un instrumento de **GeneXpert** y un ordenador, y es el único ensayo con precalificación por la OMS como PoCT y marcado CE-IVD para la detección del RNA-VHC en plasma (105 minutos) o sangre capilar fresca (58 minutos) (151). Además, en un estudio realizado por Lamoury *et al.*, el ensayo demostró una buena sensibilidad con muestras de sangre capilar respecto a plasma (152). Recientemente también se ha comercializado el PoCT **Genedrive HCV ID Kit** (Sysmex Diagnostics), que al igual que el ensayo de *Cepheid* tiene precalificación por la OMS y marcado CE-IVD para la detección del RNA-VHC, aunque este último sólo se ha validado en plasma, por lo que requiere de separación previa. No obstante, en los próximos años se espera la salida al mercado de ensayos basados en nuevas tecnologías y materiales que permitan un resultado más rápido y más económico que facilite su implementación en regiones con pocos recursos. De igual manera, la adaptación de estos ensayos para la lectura remota de los resultados por personal cualificado abre nuevos caminos hacia la mejora del acceso al diagnóstico (146).

Finalmente, la obtención de sangre seca obtenida mediante sangre capilar por punción dactilar (muestras de DBS) representa una alternativa real para el diagnóstico del VHC. Esta requiere únicamente de unas tarjetas con papel de filtro (Whatman) especialmente preparado para embeber la sangre capilar (cada círculo puede adsorber unos 50µL de sangre capilar), que después de dejarse secar, pueden ser transportadas al laboratorio por correo ordinario y a temperatura ambiente. Las muestras de DBS se han utilizado durante muchos años para detectar trastornos metabólicos en el recién nacido (153), así como para el diagnóstico del VIH (154), y fueron validadas por

primera vez para la detección de anti-VHC (155) y RNA-VHC (156) a finales de la década de los 90.

La utilización de estas muestras ha demostrado ser eficaz en diferentes escenarios y ha sido recomendada por la OMS debido a (i) su fácil recolección y aceptabilidad, (ii) fácil transporte (temperatura ambiente), y (iii) alta sensibilidad y especificidad de los ensayos moleculares para la detección del RNA-VHC a partir de muestras mínimamente invasivas (109,157).

Los DBS pueden utilizarse para la detección de los anti-VHC con técnicas de EIAs, aunque su interpretación requiere del establecimiento de un nuevo *cut-off* para la matriz de eluido de sangre seca en lugar de suero. En un meta-análisis realizado por Lange *et al.*, en el que se evaluaron 19 estudios, la sensibilidad y especificidad para la detección de los anti-VHC fueron del 98 y 99%, respectivamente (158). En otro meta-análisis en el que se evaluó la detección del RNA-VHC, la sensibilidad variaba entre el 80 y el 100%, dependiendo del estudio (157). Diferentes plataformas de casas comerciales como Roche, Abbott y Hologic han sido evaluadas para la extracción y detección de ácidos nucleicos a partir de DBS (149). No obstante, los ensayos en DBS presentan algunas limitaciones, como la menor sensibilidad para la detección del RNA-VHC en comparación con los ensayos en plasma, o la variabilidad entre las diferentes técnicas, debido a múltiples factores como el volumen de sangre empleado, la eficiencia de la extracción de los ácidos nucleicos o la degradación del RNA en condiciones extremas de almacenamiento de las muestras en países donde la temperatura y la humedad son elevadas (149). Así pues, aunque esta muestra representa una

valiosa herramienta para la mejora del acceso al diagnóstico del VHC y facilita la descentralización de este, existe la necesidad de crear unos estándares de calidad para la aprobación del diagnóstico *in-vitro* (marcado CE-IVD) de los ensayos que utilizan DBS, como anteriormente se realizara para el VIH. Durante años se han estado usando técnicas desarrolladas *in-house* o técnicas comerciales que han sido validadas para el uso de DBS bajo las condiciones de cada laboratorio, pero no ha sido hasta julio de 2020 que se ha podido disponer de un ensayo de carga viral del VHC a partir de DBS con marcado CE-IVD (Abbott Molecular) y aún no se dispone de ningún ensayo serológico aprobado para diagnóstico *in-vitro* (151). Este hecho ha limitado el uso de los DBS por parte de los laboratorios de microbiología clínica. Recientemente, Roche ha desarrollado las *plasma separation cards*, que permiten separar el plasma a partir de la sangre capilar, y que ha recibido la precalificación por la OMS, aunque no tiene el marcado CE-IVD.

El uso de diferentes RDTs, PoCT y DBS han sido validados para el cribado del VHC en varios escenarios, probando su aplicabilidad y eficacia donde no es posible realizar las técnicas convencionales. Asimismo, el desarrollo de nuevos ensayos y tecnologías capaces de detectar el VHC serán fundamentales para alcanzar los objetivos de eliminación del VHC fijados por la OMS (149). En 2015, cuando se diseñó el estudio HepCdetect II en que se basa la presente tesis doctoral, a pesar de haber una evidencia sólida de la utilidad de los DBS para la detección del RNA-VHC, se necesitaban más estudios de su uso en vida real para el cribado comunitario. En este contexto, nuestro grupo había validado previamente en el laboratorio un nuevo ensayo para detectar el

RNA-VHC en sangre seca por primera vez en España (LID de 541 UI/mL) (1), a partir del cual se establecerían la mayoría de objetivos presentados en esta tesis. Asimismo, en ese momento no se había llevado a cabo la validación de ningún ensayo PoCT para la detección del RNA-VHC fuera del laboratorio de diagnóstico.

1.3.6. Estrategias de cribado de la hepatitis C

El diagnóstico precoz y la identificación de casos ocultos constituyen el primer paso para el acceso al tratamiento y la prevención de la transmisión del VHC. Para ello, es necesaria la implementación de la estrategia de cribado más adecuada en cada escenario, especialmente en poblaciones a riesgo de contraer la enfermedad como las PQID, los HSH, las personas que conviven con el VIH, las personas en prisión o los migrantes de países endémicos, que en muchas ocasiones se enfrentan a diferentes barreras (sociales, administrativas, estructurales...) para el acceso a la atención sanitaria (159).

Los **hospitales** constituyen los principales puntos de diagnóstico y tratamiento actualmente, llevado a cabo en su mayoría por hepatólogos y médicos especialistas en enfermedades infecciosas. Aunque estos atienden regularmente a diferentes poblaciones de riesgo, como los pacientes sometidos a transfusiones de sangre (personas con hemofilia o personas que recibieron transfusiones antes de la implementación de los controles de cribado en 1992), en hemodiálisis, pacientes psiquiátricos, otros grupos como las PQID o algunos migrantes de países endémicos no acuden a estos centros. En estos casos, las estrategias de cribado oportunista

realizadas en la comunidad han demostrado ser efectivos para la identificación de casos ocultos de hepatitis C. Diferentes estudios han demostrado una alta aceptabilidad y altas tasas de positividad entre migrantes que acceden a centros de salud internacional, PQID que acuden a CRD, farmacias adscritas a programas de intercambio de jeringas (PIJ) y programas de mantenimiento con metadona (PMM), o HSH VIH positivos que acuden a centros comunitarios de salud sexual. Además, estas estrategias ayudan a la normalización de la prueba, así como a reducir el estigma y mejorar el acceso al diagnóstico entre poblaciones vulnerables (160,161). Otras plataformas, como las unidades móviles, han demostrado ser efectivas para alcanzar poblaciones como la gente sin hogar (161).

En 2017, la OMS publicó una guía para el cribado de las infecciones por hepatitis B y C (109). En esta se recomienda el cribado de la hepatitis C en las poblaciones más afectadas, como los migrantes de países con una endemicidad alta/intermedia, o aquellas con un historial de exposición de alto riesgo de infección por el virus (PQID, personas en prisiones, HSH, trabajadores del sexo o personas que viven con el VIH y sus parejas). También se recomienda el cribado en población general en entornos con una seroprevalencia $\geq 5\%$, así como promueve la búsqueda de sinergias mediante estructuras existentes, como las clínicas prenatales, las clínicas para refugiados o migrantes, las clínicas para el VIH y la tuberculosis, o las clínicas de atención crónica, entre otras.

Otra guía elaborada por el ECDC en 2018 describía seis principios para el diagnóstico eficaz de la hepatitis C; 1) el diagnóstico tiene que ser accesible, voluntario y

confidencial, 2) la necesidad de asesoramiento en prácticas de riesgo, atención médica y otra educación sanitaria, 3) la existencia de vías efectivas para la vinculación al sistema sanitario después del diagnóstico, 4) la posibilidad del cribado en diferentes centros de salud y comunitarios, 5) el asesoramiento a las personas que realizan el cribado, y 6) la disponibilidad de una estrategia de cribado a nivel nacional. Además, se establecían las condiciones y frecuencia de cribado en diferentes poblaciones de riesgo (por ejemplo, se recomendaba el cribado cada seis meses en PQID activas, dependiendo de la epidemiología local) (160).

En España, en 2020 se publicó la primera guía de cribado de la infección por el VHC, en la que se establecía la necesidad de cribar, al menos una vez en la vida (cada 6-12 meses si la exposición es continuada), a las personas que mantienen exposiciones y situaciones de riesgo para la infección por el VHC (114) **(Tabla 1)**.

Tabla 1. Exposiciones y situaciones de riesgo para la infección por el VHC en las que está indicado el cribado del VHC
Exposiciones de riesgo para la infección por el VHC
Consumo de drogas por vía inyectada y/o inhalada
Relación sexual de riesgo ^a
Pareja sexual con infección activa por el VHC o con consumo activo de drogas inyectadas
Co-infección por el VIH y/o VHB
Tatuajes y/o procedimientos estéticos y similares realizados con instrumental punzante sin las debidas precauciones de seguridad
Exposición laboral al VHC ^b
Ingreso en unidades de hemodiálisis crónica
Intervenciones sanitarias invasivas realizadas en lugares sin las medidas de seguridad adecuadas, como intervenciones quirúrgicas con material no esterilizado antes de 1975 o la recepción de productos sanguíneos o hemoderivados antes de 1990
Recién nacidos/as de madres con infección por el VHC
Situaciones de riesgo para la infección por el VHC
Ingreso en centros penitenciarios
Procedencia de países con prevalencia de infección por el VHC media o alta ^c

^a Prácticas sexuales con riesgo de sangrado como el *fisting*; *chemsex*; presencia de ITS con ulceraciones genitales o proctitis.

^b Se recomienda consultar el Documento de Consenso sobre Profilaxis postexposición ocupacional y no ocupacional en relación con el VIH, VHB y VHC en adultos y niños (77) y la Guía de Bioseguridad para los profesionales sanitarios (38).

^c Se considera prevalencia media si prevalencia de anticuerpos anti VHC $\geq 2\%$ y $< 5\%$, y alta si prevalencia de anticuerpos anti VHC $\geq 5\%$ (9,10,12,13,16) En España, se refiere principalmente a las regiones de Europa Oriental (Rumanía, Ucrania, Rusia), Asia del Sur y Central (Pakistán), y África Occidental y Central (Nigeria, Senegal). (56,78) Se puede consultar los países con prevalencias medias o altas en el apéndice 1.

Tabla 1. Exposiciones y situaciones de riesgo para la infección por el VHC en las que está indicado el cribado del VHC, según la guía española de cribado de la infección por el VHC. Fuente: Guía de cribado de la infección por el VHC, 2020 (114).

El documento también anunciaba la evaluación en marcha del cribado poblacional en personas pertenecientes a cohortes de nacimiento con mayor prevalencia, que se está llevando a cabo por un grupo técnico a partir de un informe que evaluará la evidencia

de la eficacia clínica y de la relación coste-efectividad. En este contexto, un estudio nacional realizado por M. Buti *et al.* concluía que el cribado de la población general era costo-efectivo frente al cribado específico en poblaciones de riesgo (162). Asimismo, el seguimiento de los posibles contactos ha demostrado ser beneficioso tanto a nivel individual (en términos de morbi-mortalidad) como a nivel de salud pública (previniendo la propagación de la infección), aunque está pobremente implantado a nivel europeo (163).

1.3.7. Modelos de atención de la hepatitis C

En los últimos años se han descrito numerosos modelos de atención para la hepatitis, que han mostrado la importancia de simplificar los circuitos de diagnóstico y tratamiento, así como adaptar la atención al entorno de las personas con mayor vulnerabilidad. La estrategia de eliminación de la hepatitis C en Egipto constituye un excelente ejemplo de un programa de eliminación a nivel nacional. Este país, con una seroprevalencia entorno al 15% debido a la utilización de material no estéril en campañas de tratamiento de la esquistosomiasis entre los años 1950s y 1980s, elaboró en 2018 una estrategia en coordinación con las diferentes partes interesadas (administración, instituciones sanitarias y pacientes), en la que se cribó a todas las personas de 18 a 59 años. El plan se llevó a cabo a través de campañas educativas de promoción de la salud, y se realizó el diagnóstico de la hepatitis C (el mismo día realizaban detección de anti-VHC y si positivo llevaban a cabo la detección de RNA-VHC) en diferentes entornos clínicos y comunitarios (por ejemplo, unidades móviles),

sin coste para el paciente. En menos de un año, el programa de eliminación del VHC cribó a 49,6 millones de personas, e iniciaron tratamiento el 92% de los 1,15 millones de personas infectadas por el VHC, con una RVS del 98% (164).

A destacar los modelos ECHO (*Extension for Community Healthcare Outcomes*), el primero de los cuales nació en 2003 en Nuevo México, que fue la primera región en crear una plataforma basada en la telemedicina en la que médicos especialistas formaban y ayudaban a los médicos de familia de las zonas rurales a tratar la hepatitis C. En la actualidad, numerosos modelos ECHO se han implementado con éxito en todo el mundo, mostrando una notable capacidad de escalar el diagnóstico y tratamiento en diferentes poblaciones de difícil acceso a la atención especializada (165).

Un plan nacional pionero que merece ser mencionado es el elaborado por el gobierno escocés en 2008, que es un ejemplo de coordinación a nivel nacional y local mediante un enfoque multidisciplinar en el que se involucraron las diferentes instituciones, con la participación de las agencias de salud y las autoridades locales, que abarcó todas las zonas geográficas, entornos y ámbitos de necesidad de servicios (prevención, diagnóstico, tratamiento y atención), y que consta de un sistema de monitorización y evolución. Gran parte de los recursos de este plan fueron destinados a las PQID, el centro de la epidemia por VHC en Escocia. Mediante la implementación de estrategias como la utilización del DBS o la incorporación de farmacéuticos comunitarios en el circuito de atención, Escocia pretende alcanzar las metas de eliminación marcadas por la OMS en 2024 (93). En este contexto, la región escocesa de Tayside ha sido la

primera en alcanzar dichos objetivos, mostrando la eficacia de las estrategias de eliminación en un área geográfica concreta basados en la comunidad (166).

De hecho, en 2017 la Asociación Europea para el estudio del Hígado (European Association for the Study of the Liver, EASL) propuso una nueva estrategia con la que poder alcanzar las metas de eliminación del VHC marcadas por la OMS: la **micro-eliminación**. La justificación de este enfoque es que la eliminación a pequeña escala puede considerarse un objetivo más tangible y realista, con la idea de que sirva como puente para el desarrollo de programas nacionales que finalmente conduzcan a la eliminación global o macro-eliminación.

La micro-eliminación basa su estrategia en una población específica, que puede referirse a un entorno específico (p.e. personas en prisión o en unidad de diálisis), un grupo con características clínicas específicas (personas que viven con el VIH o personas con trastornos sanguíneos), un sistema sanitario específico (como el sistema sanitario destinado a los veteranos de guerra en Estados Unidos), o un área geográfica específica (167–169).

Un ejemplo de estrategia de micro-eliminación es la llevada a cabo en la prisión de El Dueso (Cantabria, España), donde se aplicó una estrategia de diagnóstico y tratamiento *in situ* (diagnóstico y tratamiento) e implementación de un sistema de cribado periódico a los internos cada seis meses. El programa fue aceptado por el 99,5% de los internos, y se trató a todos los participantes que permanecieron en prisión más de 30 días (69 pacientes), con un 97% de RVS. Finalmente, ninguno de los internos presentó una reinfección durante el periodo de seguimiento (170).

En el plan de macro-eliminación llevado a cabo en Egipto también se pueden observar programas de micro-eliminación, como el llevado a cabo en aldeas individuales del delta del Nilo, en el que se hacía un cribado, evaluación del estado de fibrosis y tratamiento universal el mismo día adaptado a las necesidades específicas de cada pueblo. Aunque se utilizaron estrategias similares en cada pueblo, se puede considerar cada uno de ellas como proyectos de micro-eliminación, que, además, sirvieron como modelo para el desarrollo de un plan (80).

Las PQID, una de las poblaciones más afectadas por la hepatitis C, deben ser una población prioritaria para las intervenciones de micro-eliminación, para prevenir y tratar la infección. Si se quiere lograr la eliminación de la hepatitis C, se requieren modelos centrados en las personas, que proporcionen un marco de acción en el que las PQID se involucren en todos los procesos de su atención, desde el diagnóstico hasta el tratamiento y la atención de seguimiento (171).

1.4. Hepatitis C en PQID

1.4.1. Situación epidemiológica de las drogas en Europa y España

La definición de dependencia a las drogas no está exenta de un alto grado de debate generado por plasmar una realidad compleja y difícil de describir. No obstante, el **Observatorio Europeo de las Drogas y Toxicomanías** define el consumo de drogas de alto riesgo como el uso reiterado de droga/s que provocan dependencia en la persona causando daños físicos, psicológicos y sociales (172), o que expone a dicha persona a una probabilidad o riesgo elevados de sufrir estos problemas.

En el escenario Europeo la evolución del consumo de drogas hacia sustancias psicoactivas de diseño y nuevas plataformas de venta (como por ejemplo a través de internet) muestra una realidad cambiante y cada vez más compleja (173). Según el Informe Europeo sobre Drogas publicado en el 2018, España se situaba como el primer país en cantidad incautada de diferentes drogas, como el cannabis o la cocaína, lo que sugiere no solo el tráfico de estas sustancias, sino también la producción. En lo que refiere a la vía de administración, se puede percibir una disminución del consumo de drogas por vía parenteral. En España, por ejemplo, solo un 8% de los consumidores de opiáceos utilizan esta vía. En Cataluña también ha apreciado una clara evolución tanto en el tipo como en la vía de consumo; desde los años setenta, con la irrupción de la heroína, se ha observado un aumento del consumo de cocaína y cannabis. Asimismo, la administración por vía parenteral ha disminuido (ahora se encuentra en torno al 30% de las usuarios que consumen heroína), a favor de otras vías como la inhalada o la intranasal (172).

También cabe destacar el incremento del uso de medicamentos opiáceos en personas jóvenes, relacionado directamente con el aumento de comorbilidad (intentos de suicidio, episodios de sobredosis, etc.), así como a una mayor prevalencia del VHC. Aunque este problema se ha notificado mayoritariamente en EUA, otros países como Canadá o Australia también han reportado esta problemática (174).

Por otro lado, la mejora del abordaje terapéutico de la dependencia ha mejorado substancialmente en Europa en las últimas décadas; se han introducido programas de reducción de riesgos con el objetivo de dar un tratamiento integral a la problemática

de la drogodependencia, principalmente en torno a la prevención de la mortalidad por sobredosis y la propagación de infecciones en este colectivo, incluyendo la hepatitis C. Cabe destacar la implementación de dos proyectos; el PIJ y el PMM, además de otros incorporados posteriormente en los servicios de reducción de daños, como las salas de consumo supervisado, los programas de intervención de la sobredosis o los programas de dispensación de heroína. Estas estrategias han proporcionado una evidencia contrastada tanto en la disminución de la morbi-mortalidad por el consumo de drogas inyectables como en la prevención de infecciones transmitidas por vía parenteral (172,175).

1.4.2. Prevalencia e incidencia de la hepatitis C en PQID

Los PQID han sido históricamente una población “core” en la epidemia de la hepatitis C (176). En comparación con la población general, los PQID presentan más riesgo de arresto policial, encarcelación, intercambio de sexo por dinero y vivienda inestable, factores asociados a un riesgo elevado de transmisión del VHC (177). Según un meta-análisis llevado a cabo por J. Grebely *et al.*, en 2015 la prevalencia global de la infección por el VHC en PQID activos era del 39,2%, representando 6,1 millones de personas (**Figura 16**) (178). Un estudio publicado en 2017 estimaba que en ese momento había en España alrededor de 150.000 PQID, de los cuales entre el 60 y 80 % habían tenido contacto con el VHC alguna vez (179). Además, la inyección de drogas por vía parenteral representa la principal vía de transmisión del VHC en Europa; el 49% y 61% del total de nuevas infecciones agudas y crónicas, respectivamente, fueron



atribuibles a esta vía según el Informe Epidemiológico de 2018 del ECDC (180). En un meta-análisis se estimó que previniendo los casos de hepatitis C asociados a la inyección de drogas por vía parenteral se evitarían el 43% de las infecciones incidentes a nivel global (el 79% en países de alta renta) (181).

Las PQID no solo presentan un mayor riesgo de infección y reinfección, sino también de progresión de la enfermedad, mortalidad y transmisión del VHC (182). El abordaje de este colectivo es clave para alcanzar los planes de eliminación del VHC fijados por la OMS, dada su alta prevalencia e incidencia. Para ello, es necesario una cobertura amplia de los servicios de reducción de daños para la prevención de la transmisión, así como modelos centrados en el paciente que ofrezcan el diagnóstico y tratamiento del VHC de manera integrada en los servicios de reducción de daños o centros de tratamiento de drogodependencias (91,109,183).

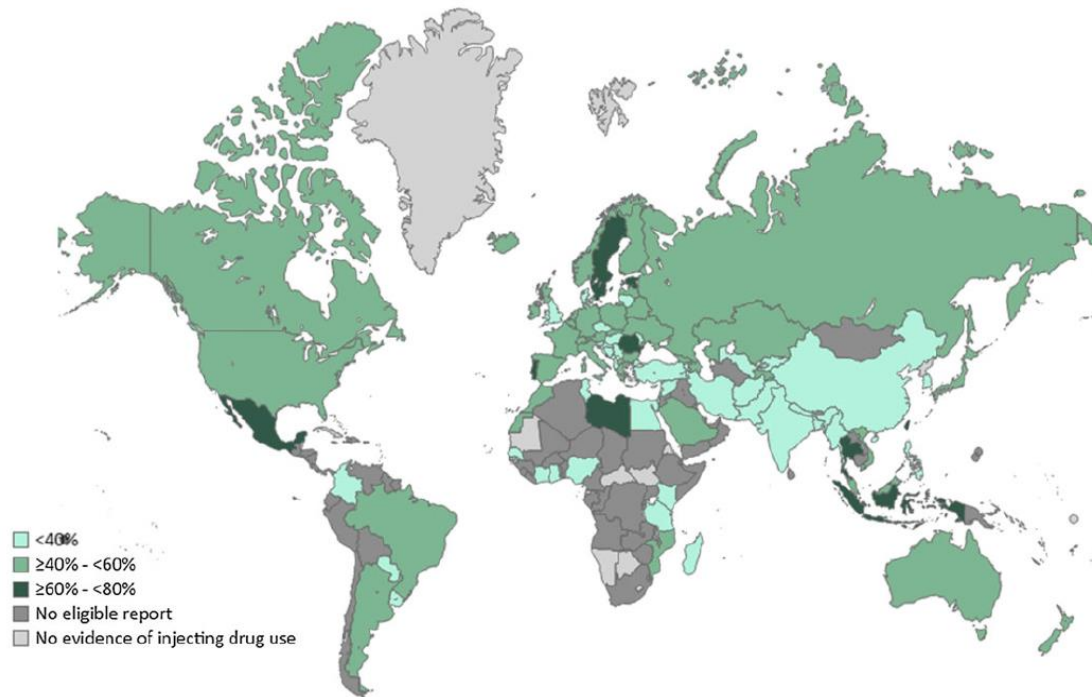


Figura 16. Prevalencia del VHC en PQID con historial reciente de uso de drogas por vía parenteral. Fuente: J. Grebely *et al.*, 2019 (178).

1.4.3. Reducción de daños y prevención de la hepatitis C en PQID

La práctica de compartir jeringas y agujas usadas por otras PQID constituye el principal factor asociado a la infección por el VHC en esta población. Además, otros factores de riesgo descritos son compartir otro material de inyección (recipientes, filtros, agua) o practicar “*front-backloading*”, que consiste en transferir restos de droga disuelta desde una jeringa a otra. Los programas PIJ, a través de la provisión de agujas, jeringuillas, material de inyección y material para otras vías de consumo, y los PMM, constituyen las dos principales vías de prevención primaria para el VHC en PQID, así como el primer punto de contacto con los servicios que proporcionan apoyo a los usuarios. Su

implementación ha sido reconocida por la OMS y ONUSIDA como un objetivo prioritario para la reducción del riesgo asociado al consumo de drogas. El plan de eliminación del VHC redactado por la OMS sugería una cobertura de 300 jeringas y agujas distribuidas por usuario anualmente como medida específica a alcanzar para el 2030. Los servicios de reducción de daños constituyen un ambiente libre de estigma y discriminación, óptimo para iniciar una vinculación a la atención sanitaria (184). Un meta-análisis reciente mostró que tanto ambas medidas por separado como combinadas (PIJ y/o PMM) disminuían substancialmente la aparición de nuevas infecciones por VHC en PQID (185). Su instauración también ha probado ser eficaz en la disminución de las conductas de riesgo asociadas a la infección por VHC, además de una estrategia costo-efectiva en países como el Reino Unido, Australia o Estados Unidos (175,186). No obstante, según los últimos datos del Centro Europeo de Monitorización de Drogas y Toxicomanías, solo el 47,4% y el 26,7% de los países europeos disponían de una cobertura amplia de servicios de PMM y PIJ, respectivamente. Además, las políticas de criminalización presentes en muchos países suponen una barrera para la normal implementación de estos servicios (183,187).

En Cataluña, los servicios de reducción de daños se iniciaron a principios de los años 1990s noventa impulsados por el Departamento de Salud, la Agencia de Salud Pública de Barcelona y el Colegio de Farmacéuticos de Barcelona (172). Actualmente, una red de servicios de reducción de daños (entre los que se encuentran los CRD, las farmacias comunitarias y los centros de atención primaria entre otros) se encargan de proporcionar el material de inyección. Los principales servicios y programas que llevan

a cabo son el PIJ, la atención sociosanitaria (abordar las necesidades médicas, de salud y psicosociales), las salas de consumo supervisado y el programa de prevención de sobredosis de Cataluña. En el ámbito del programa PIJ, a parte de la dispensación de material higiénico para el consumo, se ofrecen otras prestaciones como educación sanitaria, dispensación de otros materiales para el consumo inhalado o preservativos para prevenir las enfermedades de transmisión sexual. Otra prestación de reducción de daños son las salas de consumo supervisado, espacios donde las PQID pueden consumir drogas no legales de manera segura y acompañados de profesionales sanitarios, con la finalidad de facilitar una práctica de venopunción higiénica y sin riesgos de infección y complicaciones orgánicas, prevenir las sobredosis y reducir la morbi-mortalidad asociada al consumo de drogas.

Según el informe elaborado por la Agencia de Salud Pública de Cataluña sobre el sistema de información sobre drogodependencias de Cataluña, en 2019 se atendieron 6.729 personas en los servicios de reducción de daños, y se calcula que se distribuyeron, de media, 177 jeringas por cada PIQD. Aunque estos valores indicarían una cobertura media-alta según los valores establecidos por la OMS, siguen siendo insuficientes respecto a los objetivos marcados por la misma organización para conseguir la eliminación de la hepatitis C (300 jeringas por persona/año). En el aspecto sanitario, se llevaron a cabo más de 800 cribados de VIH, VHB y/o VHC (detección de anti-VHC), además de una actividad intensa en cuanto a educación y consejo sanitario (188). Los CRD se integran dentro de una red pública de recursos (Red de Atención a las Drogodependencias) que se encarga de la atención y el seguimiento de problemas

relacionados con el consumo, el abuso y/o la dependencia de sustancias psicoactivas. Esta red proporciona atención sociosanitaria y comunitaria para todo tipo de drogodependencias a través de diferentes servicios distribuidos por todo el territorio catalán (Figura 17).



Figura 17. Recursos de la Red de Atención a las Drogodependencias ofrecidos por el Departamento de Salud de la Generalitat de Cataluña a través de la Subdirección General de Drogodependencias de la Agencia de Salud Pública de Cataluña y el Plan director de salud mental y adicciones. Fuente: www.drogues.gencat.cat/

Además, en Cataluña, desde el año 2008 se realiza el estudio REDAN de monitoreo bio-conductual coordinado por el Centro de Estudio Epidemiológicos sobre las Infecciones de Transmisión Sexual y Sida de Cataluña (CEEISCAT) en PQID que acuden servicios de reducción de daños. Este ha permitido analizar la tendencia de la seroprevalencia por VHC en este colectivo, que muestra una leve tendencia a la baja desde el 2008, aunque sigue siendo extremadamente elevada, del 65,8% en el corte transversal 2014-2015 (189).

En definitiva, el objetivo final de la reducción de daños en el colectivo de PQID es la mejora de las condiciones para evitar la infección y la reinfección por los agentes causales de enfermedades infecciosas como las hepatitis víricas o el VIH. No obstante, el abordaje en esta población requiere de una perspectiva global que cubra las necesidades y demandas de las PQID, entre las cuales se incluye el acceso al sistema sanitario y la aceptación de dichos colectivos en riesgo de exclusión social (190).

1.4.4. Mejora del diagnóstico, acceso al sistema sanitario y tratamiento de la Hepatitis C en PQID

A pesar de la importancia de las PQID en la epidemia de hepatitis C, las tasas de diagnóstico y tratamiento en esta población siguen siendo muy bajas. Estos servicios se llevan a cabo en centros sanitarios especializados, el alcance de los cuales a menudo implica superar diferentes barreras sociales (marginalización y discriminación de los PQID), administrativas, sanitarias y/o estructurales (referido a políticas, prácticas o normas que favorecen la marginalización de un colectivo) por parte de las PQID que

impiden el correcto abordaje de la enfermedad (**Figura 18**) (191,192). El curso asintomático de la hepatitis C, además, provoca un desconocimiento del estado de infección virémica hasta llegar a fases avanzadas de esta, así como una infravaloración del riesgo asociado a la propia enfermedad (193).

Barreras para la eliminación de la hepatitis C en personas que se inyectan drogas

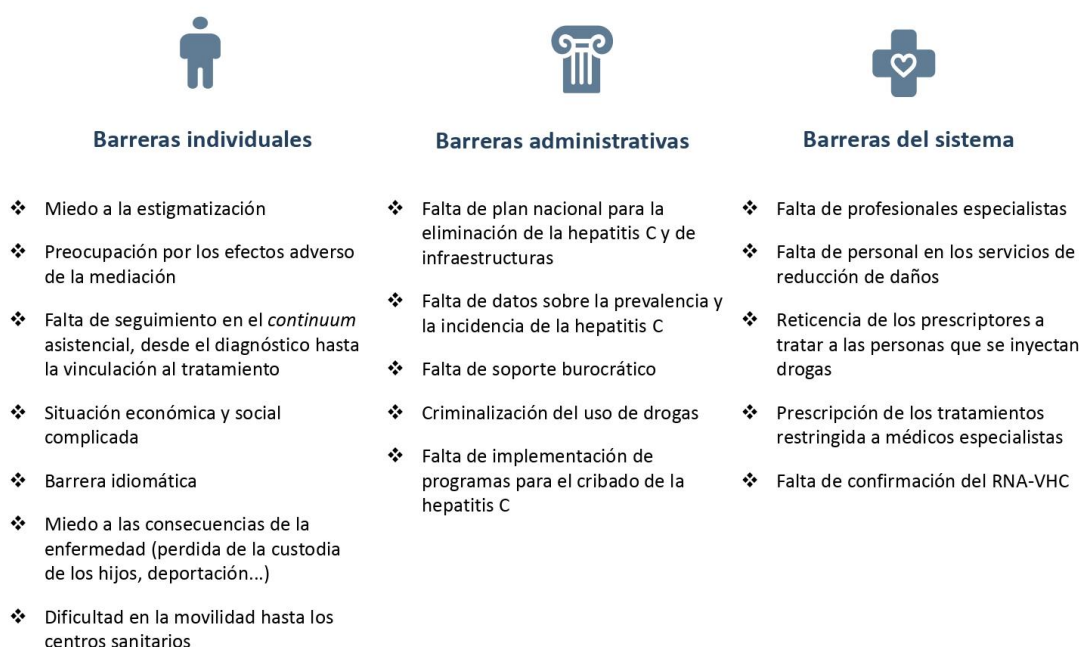


Figura 18. Barreras para la eliminación de la hepatitis C en PQID. Fuente: A. Versfeld *et al.*, 2020 (194)

Igualmente, la identificación de la infección virémica en PQID puede verse obstaculizada por otros factores, como la reticencia de esta población a realizarse

flebotomías debido al acceso venoso difícil o el miedo a los efectos adversos de tratamientos antiguos frente a la hepatitis C basados en el interferón, que eran la única opción disponible hasta la aprobación de los AAD. Además, el algoritmo convencional de diagnóstico en dos pasos del virus (detección de los anti-VHC, y si positivo, carga viral en una segunda muestra), hace necesario varias visitas regladas a los centros sanitarios, lo que provoca un aumento de pérdidas en el seguimiento (195). En general, a pesar de que muchas PQID refieren resultados previos de anti-VHC (cerca del 80%), hasta el 30% no llega a realizarse la prueba confirmatoria para la detección del RNA-VHC (196–198), y únicamente el 32% ha recibido alguna vez tratamiento frente a la hepatitis C (199).

Debido al riesgo elevado de transmitir la enfermedad, las PQID han sido considerados una población clave por la OMS para el diagnóstico de la hepatitis C y la aparición de los nuevos AAD ha hecho posible que sean priorizadas para su tratamiento por las guías internacionales (123,125). La aparición de los nuevos tratamientos orales, con pautas cortas y sin contraindicaciones importantes, abre una oportunidad para la eliminación de la hepatitis C en este colectivo. Un meta-análisis reciente mostraba que las tasas de RVS en PQID (alrededor del 90%) era similares a las de la población general (200).

No obstante, para escalar las tasas de tratamiento en los PQID de manera equitativa y efectiva se necesitan **estrategias simples y fáciles de implementar** en los servicios comunitarios a los que esta población asiste habitualmente, que permitan identificar a las personas que viven con VHC, así como la manera óptima de manejar el tratamiento

y su adherencia (146,183,193) (**Figura 19**). El abordaje *in situ* del VHC en los CRD, centros de atención a la drogodependencia, centros de atención primaria, clínicas de salud mentales o prisiones ha demostrado ser una medida eficaz para el incremento de las tasas de diagnóstico y tratamiento en PQID. No obstante, la prescripción de los AAD sigue siendo exclusiva de los médicos especialistas en muchos países, como en España (a excepción de algunos centros penitenciarios (201), lo que supone una barrera para la descentralización del tratamiento. En este sentido, varios estudios internacionales muestran excelentes resultados de RVS a través de la prescripción de AAD por médicos de atención primaria, enfermeras o farmacéuticos después de una formación adecuada (183). Otros modelos de atención, como los basados en la telemedicina, han evidenciado su eficacia, como muestra el estudio español en la cárcel de El Dueso mencionado anteriormente (170). De igual manera, modelos integrados por equipos multidisciplinares de profesionales médicos y no médicos, así como el apoyo de iguales, muestran ser clave para aumentar la vinculación al sistema sanitario, en el que se aborden intervenciones médicas, educativas y sociales (182,183,191,202).

El uso de muestras mínimamente invasivas como los **DBS** ha probado ser una herramienta valiosa para incrementar el diagnóstico en PQID que acuden a centros comunitarios (203,204), así como mediante estrategias novedosas a través de la auto-recogida de la muestra (205). Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, esta muestra ha demostrado ser aceptada por los PQID ya que permite obviar la venopunción (206). Dada la alta prevalencia de anti-VHC en esta población, se ha

propuesto la detección directa del RNA-VHC a partir del DBS (sin la detección previa de anti-VHC). Ello permite excluir aquellas PQID con una infección resultada, o bien con niveles indetectables de anti-VHC (como en el periodo ventana de la infección aguda o en aquellos con una respuesta sub-óptima del sistema inmunitario) (207,208). Por otro lado, el uso de DBS depende de la disponibilidad de un laboratorio centralizado donde poder enviar las muestras, lo que puede constituir una barrera en escenarios con recursos limitados. En ese sentido, el desarrollo en los últimos años de PoCT para la detección directa del RNA-VHC, que permiten la entrega de resultados en 1 hora aproximadamente, tienen el potencial de evitar pérdidas en el seguimiento de las PQID. (183,191,209).

Como se describe posteriormente, el proyecto en que se basa la presente tesis doctoral, diseñado en 2015, se centró en la necesidad del momento de evaluar nuevas herramientas y algoritmos con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la infección virémica por el VHC en PQID. En ese contexto, aún no había PoCT disponibles para la detección del RNA-VHC, y las muestras de DBS constituían una alternativa potencial para mejorar la caracterización de la epidemia en este colectivo, tanto por sus características técnicas como por su capacidad de descentralizar el diagnóstico, además de permitir identificar estimadores epidemiológicos claves, como la prevalencia de infección virémica o la incidencia.

Finalmente, la consecución de los objetivos de eliminación del VHC, pasan por la mejora de los servicios sanitarios en PQID, incluidos los PIJ y PMM, la modificación de políticas punitivas, y la implementación de modelos simplificados y con una

aproximación multidisciplinar que permita el abordaje global de las necesidades de esta población (184).

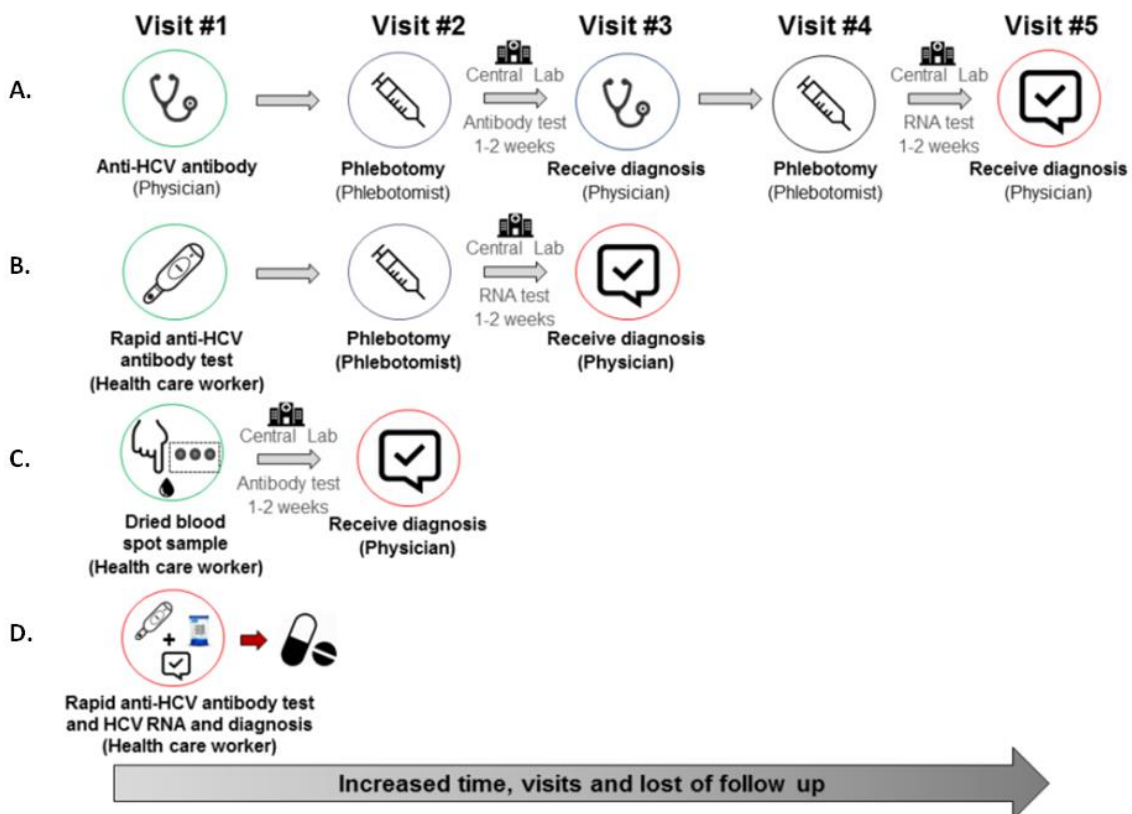
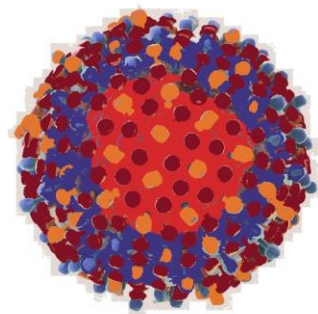


Figura 19. Representación de los diferentes algoritmos diagnósticos de la hepatitis C y el número de visitas por estrategia. A. Algoritmo convencional: detección de anti-VHC en suero y confirmación de la carga viral en suero/plasma. Con el algoritmo de diagnóstico en un solo paso (prueba del RNA-VHC refleja) se reduciría en tres días. **B.** Realización de la prueba de anticuerpos mediante un dispositivo de detección rápida sin necesidad de venopunción. **C.** Estrategia diagnóstica mediante el uso de **DBS**, que permite detectar tanto los anti-VHC como el RNA-VHC. **D.** Estrategia de diagnóstico y tratamiento *in situ*, a partir del uso de un PoCT tanto para la detección de anti-VHC como del RNA-VHC para el diagnóstico *in situ* de la infección virémica, permitiendo iniciar el tratamiento el mismo día. Fuente: J. Grebely et al., 2017 (195).

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. Justificación de la unidad temática de la Tesis Doctoral

A pesar de los importantes avances en el tratamiento antivírico, el VHC sigue siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad debido a un agente infeccioso, y un desafío para la salud pública global. En 2014, la OMS elaboró un plan estratégico para la eliminación de las hepatitis víricas como problema de salud pública, que presentó finalmente en 2016, en el cual se establecían entre los objetivos principales alcanzar tasas del 90% de diagnóstico y 80% de tratamiento para el 2030.

En la presente tesis doctoral nos centramos en la mejora del diagnóstico y la caracterización de la epidemia de VHC en PQID. Esta población presenta un elevado riesgo de infección por el VHC, y aunque se calcula que aproximadamente un tercio de la población mundial de PQID tiene una infección virémica por este virus, las tasas de diagnóstico y tratamiento son bajas. Este colectivo es vulnerable a la pobreza, a otros problemas de salud y a la estigmatización social. Además, las PQID tienen que hacer frente a múltiples barreras (sociales, administrativas, sanitarias y/o estructurales) que dificultan su acceso al sistema sanitario convencional. Por lo tanto, tanto a nivel global como regional se requería del desarrollo de nuevas estrategias para aumentar la tasa de diagnóstico y caracterizar la epidemia en esta población.

El plan estratégico para la eliminación de las hepatitis víricas como problema de salud pública publicado por la OMS en 2016 fomentaba el uso de algoritmos diagnósticos y ensayos alternativos simples, fiables y asequibles incluyendo el uso de DBS, con el fin

de facilitar el diagnóstico y aumentar el tratamiento en esta población. Sin embargo, entonces no había ensayos comerciales disponibles aprobados para el diagnóstico *in-vitro* a partir de DBS, ni para la detección de anti-VHC ni de RNA-VHC.

En 2015, partiendo de la experiencia previa de Escocia, nuestro grupo adaptó y validó una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa del RNA-VHC a partir de DBS como estrategia alternativa para mejorar el diagnóstico de la hepatitis C en HSH VIH negativos que acudían a ONGs en Barcelona (estudio *HepCdetect I*) (1). Esta técnica, con un LID de 541 UI/mL de sangre, mostró una sensibilidad y especificidad excelentes (100%) en pacientes de consultas externas de hepatología de nuestro Hospital.

En este contexto, en primer lugar nos planteamos **validar nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD.**

En el estudio *HepCdetect II* evaluamos la utilidad de la detección directa del RNA-VHC en muestras mínimamente invasivas de DBS (obtenidas por personal de los CRD a los que se formó en la recogida de las muestras), como estrategia alternativa de cribado y confirmación de la infección virémica por VHC en comparación al algoritmo clásico en dos pasos (detección del anti-VHC mediante serología, y si positiva, detección del RNA-VHC en plasma) (**Artículo I**).

Siguiendo la línea del estudio *HepCdetect II*, en uno de los CRD (el que atiende a un mayor número de usuarios) nos propusimos evaluar en vida real en PQID el primer ensayo PoCT de detección del RNA-VHC en sangre capilar fresca Xpert HCV VL Fingerstick (Cepheid) antes de que se comercializara (**Artículo II**). Este nuevo ensayo

podría facilitar la descentralización del diagnóstico y evitar pérdidas en el seguimiento de las PQID. Aunque este PoCT permite la obtención de resultados en una hora, no se conocía cuáles eran las preferencias de las PQID con respecto a la entrega de resultados. Tampoco se había evaluado la viabilidad ni el rendimiento diagnóstico de instalar el equipo de laboratorio GeneXpert para la realización de la prueba PoCT en un CRD con personal sin experiencia previa de laboratorio.

En segundo lugar, quisimos **caracterizar la epidemia de infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña**. En Cataluña, aunque existe una red de CRD donde se ofrece la prueba rápida de anticuerpos para la detección del anti-VHC, pero muchos PQID no acuden al sistema sanitario para la confirmación del diagnóstico (detección del RNA-VHC) (210). Por ello, antes de la realización del estudio *HepCdetect II*, se desconocía la prevalencia de infección virémica por VHC en este colectivo en Cataluña, que fue uno de los objetivos principales del **Artículo I** y se estimó a partir de la detección directa del RNA-VHC en muestras de DBS. También nos propusimos comprender la dinámica de la transmisión del VHC en PQID a nivel local, con el objetivo de proporcionar información necesaria para el diseño de estrategias preventivas y de tratamiento específicamente dirigidas a esta población (**Artículo III**). Para ello, era necesaria la validación de las muestras de DBS para el estudio de epidemiología molecular del VHC. Anteriormente, algunos trabajos habían validado estas muestras para caracterizar la diversidad genética inter-hospedador (genotipo/subtipo del VHC), aunque no la diversidad intra-hospedador. Por ello, llevamos a cabo una aproximación basada en NGS, a partir de los datos de la cual

podimos validar las muestras de DBS para caracterizar tanto la diversidad inter-hospedador (genotipo/subtipo) como intra-hospedador, para la que utilizamos el estimador de diversidad genética ES. Como parte del estudio de epidemiología molecular, caracterizamos los genotipos y subtipos circulantes, anteriormente desconocidos en la población de estudio. Además nos propusimos desarrollar una nueva herramienta con la que poder identificar los genotipos/subtipos del VHC a partir de datos de NGS sin la necesidad del soporte técnico de personal especializado en bioinformática.

Una vez validadas las muestras de DBS para la caracterización inter- e intra-hospedador del VHC, nos planteamos utilizar los datos obtenidos de NGS para determinar parámetros epidemiológicos claves incluyendo la incidencia y los determinantes de infección aguda y *clustering* filogenético. Para ello, nos propusimos identificar las infecciones agudas y calcular la incidencia en la población de estudio como marcadores fundamentales de la epidemia actual de VHC en la población de estudio. Como se ha explicado ampliamente en la introducción, el diagnóstico de la infección aguda del VHC es complicado, debido a que suele cursar de manera asintomática o con síntomas inespecíficos, y a que sólo se puede determinar de manera fiable a partir de 1) la detección del RNA-VHC durante el periodo ventana seronegativo, o 2) la evidencia de una seroconversión después de un resultado reciente negativo, lo que requeriría de un estudio longitudinal, con el tiempo y los costes que esto comporta. Otros marcadores alternativos, como la avidéz de los anti-

VHC, pueden verse negativamente influenciados por una respuesta inmune ineficaz, como ocurre en los casos coinfectados con el VIH.

En este sentido, V. Montoya *et al.* demostraron que la diversidad intra-hospedador de la región NS5B del VHC, determinada por el valor del estimador de diversidad genética ES estimada mediante NGS, aumenta proporcionalmente con el tiempo de infección, y en consecuencia, tiene el potencial de diferenciar las infecciones agudas de las crónicas a nivel poblacional incluso después de la seroconversión, pudiéndose utilizar como método alternativo para identificar las infecciones agudas. Por ello, nos planteamos validar el estimador SE en la población de estudio, así como utilizar por primera vez un marcador de diversidad genética para calcular la incidencia del VHC en un estudio transversal.

Por último, combinamos esta información con el análisis filogenético, también a partir de los datos de NGS. A pesar de que otros estudios han utilizado el análisis filogenético para identificar los determinantes de *clustering*, a través de este trabajo nos propusimos combinar ambas herramientas (identificación de infecciones agudas y análisis filogenético) para describir no solo los determinantes de transmisión, sino los de infección aguda, con el objetivo de caracterizar de manera exhaustiva la epidemia actual en las PQID que acuden a CRD y ayudar a diseñar intervenciones específicamente dirigidas a los perfiles que presenten más riesgo de infectarse y transmitir el virus.

2.2. Objetivos planteados

2.2.1 Validar nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD

2.2.1.1 Validar en vida real una nueva técnica de detección del RNA-VHC en muestras mínimamente invasivas de sangre capilar seca (DBS) en PQID que acuden a CRD de Cataluña **(Artículo I)**.

2.2.1.2 Evaluar la utilidad de una estrategia alternativa de cribado y confirmación diagnóstica en un único paso a partir de la detección directa del RNA-VHC en DBS **(Artículo I)**.

2.2.1.3 Validar en vida real el nuevo ensayo PoCT Xpert VL Fingerstick para la cuantificación del RNA-VHC en muestras de sangre capilar recogidas en PQID que acuden a CRD de Cataluña **(Artículo II)**.

2.2.2 Caracterizar la epidemia de infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña.

2.2.2.1 Estimar la prevalencia de infección virémica por VHC en la población de estudio **(Artículo I)**.

2.2.2.2 Validar el uso de las muestras de DBS para la estimación de la diversidad genética a nivel inter e intra-hospedador del VHC **(Artículo III)**.

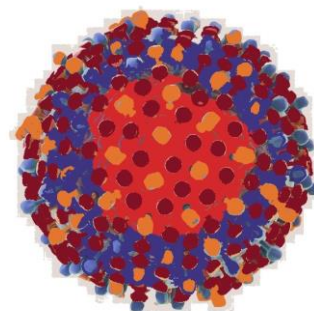
2.2.2.3 Determinar los genotipos y subtipos del VHC circulantes en la población de estudio (**Artículo III**).

2.2.2.4 Estimar la proporción de infecciones agudas por VHC en la población de estudio a partir de datos de NGS (**Artículo III**).

2.2.2.5 Identificar *clusters* de transmisión del VHC en la población de estudio (**Artículo III**).

2.2.2.6 Identificar los factores asociados a la infección aguda y el *clustering* filogenético en la población de estudio (**Artículo III**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación de nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD

Como ya se ha expuesto en la introducción de la presente tesis doctoral, el **diagnóstico convencional** de la hepatitis C se lleva a cabo en laboratorios centralizados en **dos pasos**; el primero, la serología, en el que se objetiva la exposición al virus y, si es positiva, la detección del RNA-VHC, que determina si se trata de una infección virémica o una infección ya resuelta. A pesar de que el diagnóstico denominado “en un solo paso” en España o “*reflex RNA testing*” a nivel internacional (que consta de la detección del RNA-VHC en la misma muestra de suero si la serología ha sido positiva) ha sido implementado en la mayoría de hospitales españoles, este sigue requiriendo múltiples visitas del paciente al sistema sanitario (211).

Asimismo, también se han descrito las diferentes barreras sociales, administrativas, sanitarias y/o estructurales que impiden el abordaje de esta y otras enfermedades en PQID, y que evidencian la necesidad de nuevas herramientas y algoritmos que faciliten su diagnóstico y vinculación al sistema de salud (191,192,195).

Estudio *HepCdetect* II (Artículos I y III). En el momento de escribir el proyecto *HepCdetect* II en que se basa esta tesis, algunos estudios realizados en el Reino Unido sugerían que la utilización del DBS tenían el potencial de mejorar las tasas de diagnóstico del VHC en el contexto de estrategias de cribado en la comunidad, a través

de modelos descentralizados, integrados en aquellos servicios frecuentados por parte de las PQID. No obstante, como se discute en el artículo de revisión publicado por J.T. Coats *et al.* en 2015, estos trabajos presentaban un riesgo elevado de sesgos que dificultaban la interpretación de los resultados (212). Por otra parte, en ese momento aún no se había llevado a cabo ninguna evaluación de PoCT para la detección del RNA-VHC en vida real (212).

Por ello, en el estudio *HepCdetect II* quisimos evaluar en vida real la utilidad de una técnica de detección directa del RNA-VHC en DBS puesta a punto anteriormente en nuestro laboratorio (1), como estrategia alternativa de cribado y confirmación diagnóstica de la infección por el VHC en comparación al algoritmo clásico en dos pasos.

Para ello, se reclutaron 410 PQID en activo (consumo de drogas por vía parenteral en los últimos seis meses) en cuatro CRD de la provincia de Barcelona en el periodo 2016-17 (El Local en el barrio de la Mina en Barcelona, AEC GRIS Fundación Privada en Hospital de Llobregat, Fundación *Àmbit Prevenció* en el Prat del Llobregat y Sociedad AIDE en Terrasa). Se recogieron muestras de DBS para todos los participantes y plasma para 300 PQID (en El Local o centro A, que es el que atiende a un mayor número de usuarios en Cataluña y dispone de personal de enfermería). Se realizó la detección cualitativa del RNA-VHC en DBS a partir del ensayo puesto a punto previamente en el laboratorio (1) y la cuantificación de la carga viral del VHC en plasma utilizando un ensayo comercial (Abbott RealTime™ HCV). Además, en las muestras de los usuarios del centro A con infección virémica se llevó a cabo la amplificación por PCR de un

fragmento de la NS5B para su posterior secuenciación Sanger y análisis filogenético mediante los métodos previamente puestos a punto en nuestro laboratorio (141,213), con el objetivo de identificar el genotipo y analizar la posible influencia de este en la detección del RNA-VHC en DBS. En las muestras con carga viral baja se utilizó un ensayo comercial basado en PCR en tiempo real para el genotipado (*HCV Genotype II assay* de Abbott).

Paralelamente, se utilizó un PoCT (*HCV Antibody Test Card* de LumiQuick Diagnostics) para la detección de anti-VHC en sangre capilar. Cuando el resultado de la prueba rápida de anticuerpos fue discordante con el estado autodeclarado frente al VHC, también se realizó la serología en plasma utilizando un ensayo comercial (Vitros, Ortho–Clinical Diagnostic). Asimismo, se llevó a cabo la detección de antígeno/anticuerpos del VIH (Vitros, Ortho–Clinical Diagnostic) en aquellos individuos para los que se obtuvo muestra de plasma (centro A), mientras que para los otros centros se disponía de los resultados de la prueba rápida del VIH (**Figura 20**).

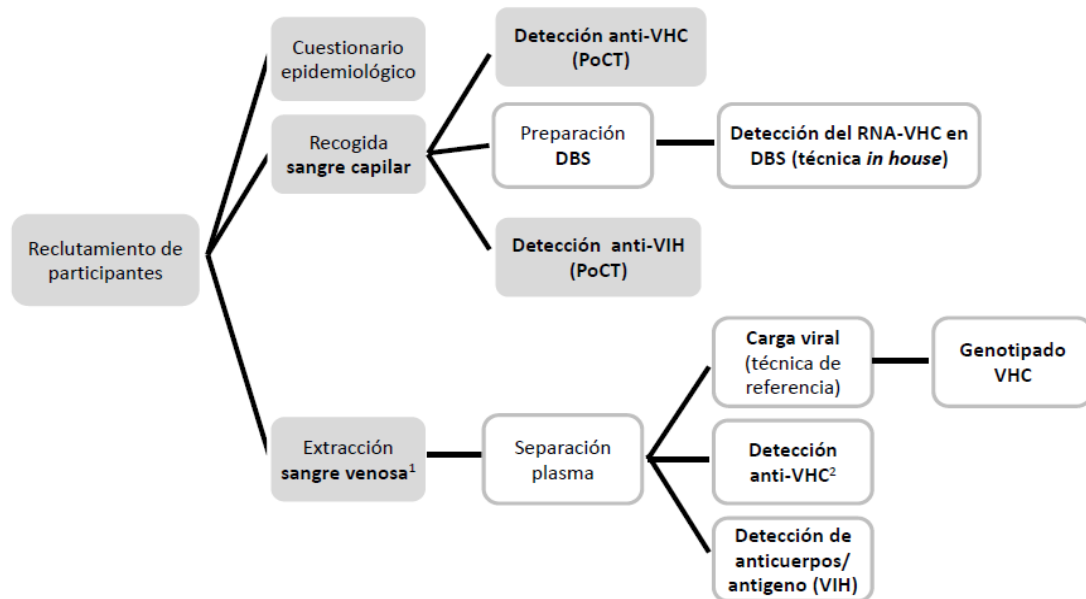


Figura 20. Diagrama de flujo del estudio y métodos utilizados. DBS: dried blood spots; PoCT: Point-of-care test; anti-VHC: anticuerpos contra el VHC; anti-VIH: anticuerpos contra el VIH. Las actividades realizadas en los CRD y en el laboratorio se indican con recuadros grises y blancos, respectivamente; ¹Solo se realizan en el centro A; ²Solo se realizan en los casos en los que se observa un resultado discordante entre el estado de hepatitis C auto-declarado y la prueba rápida para la detección de los anti-VHC en el CRD.

Características de la población de estudio. Las características socio-demográficas y conductuales de la población de estudio están resumidas en la **Tabla 1** del **Artículo I**. Todos los usuarios a los cuales se propuso el estudio, para el cual se ofrecía una pequeña remuneración económica para incentivar la participación (6€), aceptaron participar (N=410, n=300 del centro A, n=44 del B, n=27 del C y n=39 del D). La media

del tiempo de inyección fue de 17,7 años, y el 20,5% llevaba ≤ 5 años de consumo inyectado. La gran mayoría de los usuarios eran hombres (85.4%), con una edad media de edad de 40,5 (desviación estándar (DE): 8,2 años). El 28,0% nació en el extranjero, la mayoría de ellos en países de Europa del Este (65.2%) e Italia (15,6%). Un 12,9% declaró haber vivido en la calle en los últimos seis meses, mientras que un 63,8% había estado en prisión al menos una vez en la vida. De estos, un 27,0% declaró haberse inyectado drogas en la cárcel. La heroína fue la droga más consumida, seguida por la cocaína. Un 44,0% de los PQID manifestó haber compartido jeringas alguna vez, y un 52,6% otro material de inyección. El 88,5% reportó haber recibido tratamiento para la drogodependencia alguna vez en su vida.

3.1.1. Validación una nueva técnica de detección del RNA-VHC en vida real en muestras mínimamente invasivas de sangre capilar en PQID que acuden a CRD de Cataluña (Artículo I)

Evaluación de las muestras de DBS para la detección del RNA-VHC en sangre capilar.

La **recogida de muestras** de DBS fue correctamente realizada en el 99,0% (406/410) de los casos. Esto demuestra que tanto el personal de enfermería como los trabajadores sociales de los CRD aprendieron la técnica y obtuvieron muestras de calidad. Solo en las cuatro muestras restantes la calidad o cantidad de sangre no fue la adecuada. Los DBS fueron enviados y almacenados a temperatura ambiente por una media de 20,0 días (DE: 11,0 días) antes de ser procesadas.

Para la evaluación de la capacidad diagnóstica de la nueva técnica basada en DBS en comparación con la técnica de referencia en plasma, de las 300 muestras apareadas (DBS y plasma) obtenidas del centro A, 11 fueron descartadas; tres por proceder de personas que estaban recibiendo tratamiento para el VHC y las otras ocho restantes debido a un fallo en el extractor automático de ácidos nucleicos a partir de los DBS. En total, se analizaron muestras pareadas de DBS y plasma de 289 participantes. De éstas, en el 32,2% ($n=93$) no se detectó el RNA-VHC ni en plasma ni en DBS, mostrando una **especificidad** del ensayo en DBS del 100% (IC 95%: 96,0–100%). Por otro lado, la carga viral del VHC fue detectable en plasma en el 67,8% ($n=196$) de los participantes (rango de carga viral: positivo <12 a 33.096.148 UI/mL). Debido a la considerable proporción de cargas virales bajas (10,2%, $n=20/196$, por debajo de 3.000 UI/mL; 9,2%, $n=18/196$, por debajo de 1.000 UI/mL) y cargas virales muy bajas (5,1%, $n=10/196$, por debajo de 100 UI/mL), se llevó a cabo un **análisis de sensibilidad** considerando diferentes puntos de corte de carga viral con interés clínico/epidemiológico (**Tabla 2 del Artículo I**) (**Figura 21**).

HCV viral load threshold in plasma	Overall sensitivity		Sensitivity according to HIV status				p-value
	Proportion	% (95% CI)	HIV positive		HIV negative		
			Proportion	% (95% CI)	Proportion	% (95% CI)	
Detectable (below or above 12 IU/mL) ^a	173/196	88.3 (83.0–92.0)	41/48	85.4 (72.8–92.8)	132/148	89.2 (83.2–93.2)	0.480
Quantifiable (\geq 12 IU/mL)	172/191	90.1 (85.0–93.5)	41/47	87.2 (74.8–94.0)	131/144	91.0 (85.2–94.7)	0.623
\geq 1000 IU/mL ^b	171/178	96.1 (92.1–98.1)	41/42	97.6 (87.7–99.6)	130/136	95.6 (90.7–98.0)	1.000
>3000 IU/mL ^c	171/176	97.2 (93.5–98.8)	41/42	97.6 (87.7–99.6)	130/134	97.0 (92.6–98.8)	1.000
>50,000 IU/mL ^d	158/158	100 (97.6–100)	39/39	100 (91.0–100)	119/119	100 (96.9–100)	1.000

Figura 21. Sensibilidad del ensayo *in-house* de detección del RNA-VHC a partir de DBS en comparación con el método de referencia de la carga viral en plasma considerando varios puntos de corte de carga viral. IU: International Units; DBS: dried blood spots.

^a LID del ensayo Abbott, de acuerdo con el LID \leq 15 UI/mL en suero o plasma recomendado para el diagnóstico del VHC (125).

^b En entornos específicos, se puede utilizar un ensayo cualitativo para la detección del RNA-VHC con un LID \leq 1.000 UI/mL para aumentar el acceso al diagnóstico y la atención de la hepatitis C (125).

^c Según la OMS, un ensayo para la detección del RNA-VHC con un LID \leq 3.000 UI/mL sería aceptable y permitiría identificar al 95% de las personas con infección virémica (214).

^d La gran mayoría de los pacientes elegibles para el tratamiento de la hepatitis C tienen niveles de RNA-VHC >50.000 UI/mL (215).

Al considerar el punto de corte establecido por las guías clínicas para los ensayos diagnósticos de carga viral realizados en plasma (LID \leq 15 IU/mL) (125), el porcentaje de falsos negativos en DBS fue del 11,7% (23/196). El único factor asociado a un resultado

falso negativo fue tener una carga viral <1.000 UI/mL ($p<0,0001$); otras variables como la coinfección por VIH, el origen, el sexo, la edad, o el tiempo de almacenamiento de los DBS a temperatura ambiente no mostraron asociación con este resultado. Del mismo modo, no se encontró evidencia de la influencia del genotipo/subtipo identificado con la detección del RNA-VHC en DBS en los pacientes en los que se pudo llevar a cabo el análisis (no se pudo realizar el genotipado en 10/196 muestras con cargas virales <100 UI/mL). Si bien esta proporción de falsos negativos en comparación con la técnica de referencia puede parecer elevada, la detección del RNA-VHC mediante la técnica basada en DBS permitió detectar la mayoría de las infecciones virémicas en un colectivo especialmente vulnerable (el 12,9% no tenían un hogar estable y el 21,4% estaban desempleados) que habitualmente no acude a los centros de salud formales donde se ofrece el diagnóstico mediante las técnicas de referencia en sangre venosa (210).

Si, de acuerdo con las guías de la OMS, tenemos en cuenta las muestras con cargas virales superiores a 3.000 UI/mL, el ensayo mostró una sensibilidad y especificidad del 97,2% y 100%, respectivamente. La OMS incentiva el uso de ensayos para la detección del RNA-VHC con límites de detección de al menos 3.000 UI/mL, incluyendo los basados en DBS, siempre que implique una mejora en el acceso al diagnóstico del VHC (214).

La recomendación de este punto de corte (3.000 UI/mL) por parte de la OMS se basa en dos estudios realizados, a partir de los cuales se concluía que el 95% de individuos con infección virémica por el VHC presenta cargas virales por encima de 3.000 UI/mL

(216,217). No obstante, en el presente estudio, un 10,2% de los participantes estaba por debajo de ese umbral, lo que da lugar a un porcentaje de falsos negativos en DBS mayor de lo esperado. Esto puede deberse principalmente a dos factores; en primer lugar, la fibrosis avanzada o cirrosis pueden alterar la replicación del VHC en el hígado (218). En este sentido, el consumo elevado de alcohol en esta población (219), así como la baja vinculación al sistema sanitario, pueden propiciar un escenario en el que la enfermedad hepática avanzada sea frecuente (219). De hecho, en un estudio que se está llevando a cabo actualmente en PQID en activo del mismo centro A se ha descrito un grado de fibrosis avanzada en el 11% de los con infección virémica por VHC (220). En segundo lugar, la posibilidad de que los individuos con cargas virales bajas y muy bajas puedan estar en el periodo de infección aguda, durante la cual la carga viral del VHC experimenta importantes fluctuaciones, e incluso breves periodos durante los cuales sería indetectable para posteriormente volverse a detectar (221). En un estudio llevado a cabo por M. Feiman *et al.* los autores sugieren que, de hecho, la carga viral baja podría ser utilizada como un marcador subrogado de la infección aguda (217). La incidencia elevada del VHC en la población de estudio, como se reflejará en el **Artículo III** (estimación de la proporción de infecciones agudas por VHC en la población de estudio a partir de datos de NGS), refuerza esta hipótesis, en una población con múltiples factores de riesgo para la infección y, por tanto, con mayor probabilidad de encontrar infecciones agudas, ya sean infecciones primarias o reinfecciones.

Por otra parte, en el estudio llevado a cabo por Scott *et al.* mediante modelización matemática, se constata la necesidad de cribar directamente y de manera periódica el

RNA-VHC en esta población, especialmente cuando la seroprevalencia es elevada (>50%), con la finalidad de obtener un diagnóstico temprano y frenar la transmisión, para poder alcanzar los objetivos de eliminación propuestos por la OMS (222). En la misma línea, las últimas guías del ECDC recomiendan un cribado semestral en las PQID (160), lo que permitiría incrementar el número de individuos diagnosticados. Así mismo, una persona con un resultado falso negativo en una de las pruebas debido a una fluctuación en la carga viral durante la infección aguda, podría llegar a detectarse en la siguiente prueba si no aclara la infección espontáneamente.

Entrega de los resultados de RNA-VHC en DBS. Aunque el uso de DBS esté condicionado por la centralización de las pruebas a un laboratorio de referencia (lo que implica que el individuo tiene que acudir a una segunda visita en el CRD para recoger el resultado de RNA-VHC), evita la necesidad de desplazarse a los centros de salud formales y potencialmente reduce las pérdidas de seguimiento, incrementando así el número de PQID que son conscientes de su estado y esto ayuda a vincularles al sistema de salud. En el presente estudio fuimos capaces de evaluar la tasa de entrega del resultado de RNA-VHC en el centro A en una segunda visita, que fue posible en el 76,0% de los individuos virémicos ($n=155$), con una media de entrega de 90 días (RIC: 48-158 días). Idealmente, se necesitarían tasas más altas de entrega y vinculación al sistema sanitario, no obstante, la implementación en este estudio fue positiva si consideramos el volumen de trabajo en el centro A, uno de los más grandes de Europa. En este aspecto, la implementación de PoCT moleculares que permitan el diagnóstico

rápido de manera *in situ* (152), tiene el potencial de mejorar estos aspectos, lo que motivó el estudio que corresponde al **objetivo 2.2.1.3** de la presente tesis doctoral (**Artículo II**).

3.1.2. Evaluación de la utilidad de una estrategia alternativa de cribado y confirmación diagnóstica en un solo paso a partir de la detección del RNA-VHC en DBS (Artículo I)

A través de este subobjetivo, quisimos evaluar el rendimiento del diagnóstico en un único paso (detección directa del RNA-VHC en DBS) en comparación al algoritmo diagnóstico convencional en dos pasos. Como ya se ha comentado, la prueba de anticuerpos se ofrece en los CRD en Cataluña, aunque la mayoría de pacientes no acuden para la confirmación de la carga viral en los centros de salud formales (210).

Al comparar la proporción de casos virémicos (RNA-VHC positivo independientemente de la carga viral) detectados en la población de estudio por el algoritmo convencional en dos pasos (prueba rápida de anti-VHC seguido de carga viral en plasma extraído en el centro A) (64,7%: 187/289; IC 95%: 59,0–70,0%) frente a la alternativa en un único paso (RNA-VHC en DBS) (59,9%: 173/289; IC 95%: 54,1–65,3%), no se encontraron diferencias significativas ($p=0,230$). Además, la detección directa del RNA-VHC a partir de DBS tiene el potencial de mejorar el acceso al diagnóstico, ya que los usuarios pueden someterse a la prueba y recoger el resultado en una segunda visita al CRD, ambos procesos sin necesidad de acudir al sistema sanitario formal.

La **Figura 22** muestra la prevalencia de anti-VHC y RNA-VHC en la población de estudio que asiste a los CRD por años de inyección (<3, 3-5 y >5 años). En ella se puede observar como en los usuarios con más de dos años de infección la detección de anti-VHC aporta poca información, ya que este colectivo presenta una seroprevalencia muy alta (75,0 % en los que declararon 3-5 años de inyección y 87,4% en de >5 años, grupo que constituye el 80% de la muestra), es decir, la gran mayoría de personas a las que se le realice una prueba de anticuerpos, necesitarán también la prueba del RNA-VHC, por lo cual podría hacerse directamente en todos los casos. La detección directa del RNA-VHC permitiría además identificar aquellos casos en el periodo ventana de los anticuerpos (infección aguda), lo que supone una ventaja en una población en la que la incidencia del VHC es elevada (223–226), especialmente en aquellas personas que llevan poco tiempo consumiendo drogas por vía inyectada. Asimismo, permite detectar aquellos casos con niveles indetectables de anti-VHC debido a una respuesta sub-óptima de anticuerpos, como puede suceder en los individuos coinfectados por el VIH. De hecho, se ha sugerido que la eliminación del cribado mediante la prueba de anticuerpos podría mejorar el diagnóstico del VHC en personas con coinfección por el VIH (207). En el presente estudio la prueba rápida de anti-VHC fue negativa en 15 casos (6,4%). Entre estos, cuatro fueron clasificados como infecciones agudas dentro del periodo ventana de anticuerpos (la ausencia de anti-VHC fue confirmada en muestra de plasma, y todos eran VIH negativos). Por otro lado, en cinco casos si se detectaron los anti-VHC en las muestras pareadas de plasma, por lo que se consideraron falsos negativos de la prueba rápida de anticuerpos. Los cuatro casos

restantes no se pudieron clasificar debido a que no se disponía de la muestra de plasma.

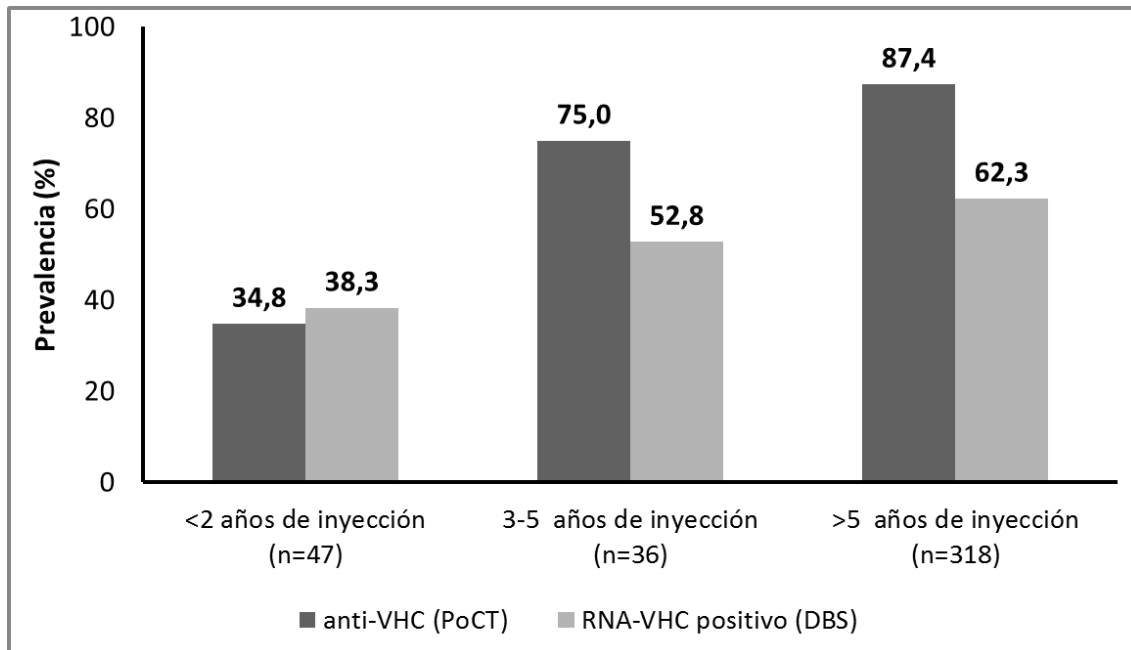


Figura 22. Relación entre la prevalencia del VHC y los años de consumo de drogas inyectables. Anti-VHC: anticuerpos contra el virus de la hepatitis C; PoCT: *Point-of-care* test; DBS: *dried blood spots*.

En conclusión, el algoritmo en un único paso de detección directa del RNA utilizando muestras mínimamente invasivas (DBS) permite simplificar el diagnóstico y vincular al tratamiento aquellos individuos con infección virémica, y a la vez, aumentar el número de PQID que son conscientes de su enfermedad. Además, el uso de DBS tiene el potencial de descentralizar no solo el diagnóstico, sino también el seguimiento del tratamiento de la infección por VHC (128), así como la evaluación periódica de la

reinfección en esta población (160). En conjunto, la nueva prueba basada en DBS permitiría mejorar el acceso al diagnóstico por parte de las PQID que acuden a CDR así como conocer y monitorizar la prevalencia de infección activa en esta población, necesario para guiar los esfuerzos hacia la micro-eliminación del VHC en PQID en el contexto del plan para la Prevención y Control de la Hepatitis C en Cataluña (comisión para la elaboración del plan de prevención y control de la Hepatitis C en Cataluña, 2018) con el fin de alcanzar los objetivos de eliminación establecidos por la OMS (99).

3.1.3. Evaluación del PoCT Xpert® HCV VL Fingerstick para el cribado y diagnóstico de la infección virémica en PQID que acuden a CRD en Cataluña (Artículo II)

En el estudio *HepCdetect II (Artículo I)*, demostramos que las muestras mínimamente invasivas de DBS eran útiles para mejorar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD de Cataluña, sin necesidad de derivar al sistema sanitario formal a todos aquellos casos seropositivos para realizarse la analítica confirmatoria de detección del RNA-VHC. En este sentido, el uso de algoritmos simplificados para el diagnóstico de la infección virémica del VHC en PQID tienen el potencial de mejorar no solo el acceso al diagnóstico sino también al tratamiento de la hepatitis C en programas descentralizados, y ayudar a establecer programas de micro-eliminación en esta población (167).

En el **Artículo I**, en el contexto del estudio *HepCdetect II*, el DBS fue implementado y evaluado para una estrategia de cribado y diagnóstico de la infección virémica del VHC

en cuatro CRD de Cataluña. De esta manera fue posible establecer la prevalencia de infección virémica, y demostró aumentar el conocimiento de la infección virémica por parte de la población de estudio (**Artículo I**). Una de las limitaciones de la detección del RNA-VHC en DBS es que no se trata de una prueba en el punto de atención (PoCT), ya que las muestras de DBS se tienen que remitir a un laboratorio centralizado. En el **Artículo I** se evaluó la entrega de los resultados de la detección del RNA-VHC en un el centro A, y fue posible en el 76,0% de los casos en un plazo de 160 días cuando el usuario volvía al mismo centro. En este contexto, la implementación de un PoCT molecular para el diagnóstico *in situ* en el mismo centro podría reducir las pérdidas de seguimiento (195). El PoCT **Xpert® HCV VL Fingerstick** (Xpert FS) es un ensayo que integra la extracción de los ácidos nucleicos, la retro-transcripción, la amplificación y la detección del RNA-VHC mediante PCR en tiempo real, lo cual requiere de un instrumento **GeneXpert** conectado a un ordenador. Este ensayo fue desarrollado a partir de la versión previa en plasma venoso para mejorar el diagnóstico de la infección virémica del VHC a partir de una muestra mínimamente invasiva de sangre capilar fresca (195), lo que permite obtener resultados cuantitativos en aproximadamente una hora (152). En 2018, nos propusimos evaluar este nuevo ensayo en su formato RUO (*research use only*), antes de su comercialización para diagnóstico *in vitro* (marcado CE-IVD).

De esta manera, el principal objetivo del **Artículo II** fue el de comparar dos estrategias de cribado y diagnóstico de la infección virémica del VHC en un único paso en PQID que atendían el CRD A, a partir de: 1) la detección del RNA-VHC en sangre capilar

fresca por el ensayo **Xpert® HCV VL Fingerstick** mediante el equipo GeneXpert instalado en el CRD, y 2) la detección del RNA-VHC en sangre capilar seca recogida como DBS en el CRD A mediante la técnica validada previamente en PQID en el **Artículo I**. Los dos ensayos fueron comparados con el método de referencia realizado en el laboratorio para la cuantificación de la carga viral en muestras pareadas de plasma, el ensayo Xpert® HCV VL. En los casos en los que hubo una discordancia entre los ensayos Xpert FS y Xpert VL se llevó a cabo la carga viral del VHC por una tercera técnica, el ensayo Abbott HCV RealTime (Abbott Diagnostics). Además, se evaluó la influencia del genotipo/subtipo del VHC y la coinfección por VIH sobre la detección del RNA-VHC. Por último, se evaluó la entrega de los resultados del RNA-VHC, así como la derivación al sistema sanitario de los casos virémicos.

Características de la población de estudio. Las principales características sociodemográficas y conductuales de la población de estudio (N=100) están reflejadas en la **Tabla 1** del **Artículo II**. La mayoría eran hombres (86,0%), con una edad media de 43,9 años; el 28,0% eran personas sin hogar estable, el 22,0% eran inmigrantes, el 69,0% habían estado alguna vez en prisión y el 71,0% utilizaba drogas por vía parenteral a diario.

En total, 99 participantes se habían sometido previamente a la prueba del VHC (de 1 a 10 veces); el 76,8 % ($n=76$) de ellos reportaron haber sido diagnosticados previamente de infección por el VHC y el 36,8% ($n=28$) haber recibido tratamiento antiviral. De este último grupo, el 85,7% ($n=24$) reportaron haber completado el tratamiento (el 50,0%

($n=14$) con tratamiento inyectado) y el 82,1% ($n=23$) haberse curado (aunque seis de ellos tenían una infección virémica en el momento de participar en el estudio).

La seroprevalencia del VHC fue del 89,0% (IC al 95%: 81,4-93,7%), y el 63,0% (IC al 95%: 53,2-71,8%) tenían una infección virémica. En dos participantes virémicos (VIH negativos) no se detectaron anticuerpos (3,2% del total de participantes con infección virémica); por lo tanto, la prevalencia de infección pasada o actual por el VHC fue del 91,0%. Por último, el 25,4% ($n=16$) de los participantes con infección virémica por el VHC presentó una coinfección por el VIH.

Evaluación del ensayo Xpert FS para la detección del RNA-VHC en sangre capilar fresca. En total, se necesitaron 113 cartuchos para generar resultados válidos para los 100 participantes. En el 11,5% (13/113) de los casos se obtuvieron resultados inválidos; i) en ocho participantes el ensayo se interrumpió una vez, mientras que en otro el ensayo se interrumpió hasta cuatro veces; ii) en un participante se obtuvo un resultado inválido debido a que se detectaron los controles en un ciclo de amplificación muy alto; y iii) en otro caso se obtuvo un resultado inválido debido al fallo de los controles, pero el resultado se validó manualmente (se dio un resultado positivo cualitativo dado que la curva de amplificación para el VHC era correcta) siguiendo las recomendaciones del servicio técnico.

La especificidad del ensayo Xpert FS (utilizando el ensayo Xpert VL como método de referencia) fue del 100% (IC al 95%, 90,1%-100%). La sensibilidad del ensayo se evaluó utilizando tres puntos de corte de carga viral (**Tabla 1, Artículo II**), tal y como se había

realizado anteriormente para el ensayo basado en DBS (**Artículo I**). Cuando se utilizó como referencia el resultado de carga viral detectable por el ensayo en plasma, la sensibilidad fue del 98,4%, mostrando una concordancia muy buena entre ambos métodos ($Kappa=0,979$). El único resultado no concordante correspondió a un participante con una carga viral positiva pero no cuantificable (<10 UI/mL) en plasma por el método de referencia, con un resultado negativo por el ensayo Xpert FS (es decir, un resultado falso negativo). La carga viral de este participante fue confirmada como positiva en plasma por el ensayo HCV *Realtime* de Abbott (positiva <12 UI/mL). Además, se confirmó la presencia de anticuerpos en plasma. En otro participante se detectó una carga viral positiva no cuantificable tanto por el método de referencia (<10 UI/mL) como por el ensayo Xpert FS (<40 UI/mL).

Para los puntos de corte de cuantificables ≥ 10 IU/mL y >3.000 IU/mL, la sensibilidad del ensayo Xpert FS fue del 100%. En una muestra con una carga viral de 5,54 Log(UI/mL) en plasma, la carga viral no fue cuantificada por el ensayo Xpert FS debido a un error en los controles del ensayo, y la curva de amplificación del VHC fue verificada manualmente como positiva (resultado cualitativo).

La media de la carga viral de los 60 participantes con resultados cuantificables fue de 5,82 Log(UI/mL) [rango: 2,56-7,46 Log(UI/mL)] para el método de referencia, y de 5,75 Log(UI/mL) [rango: 2,54-6,99 Log(UI/mL)] para el ensayo Xpert FS. La correlación entre los resultados de carga viral obtenidos por ambos métodos fue significativa (rho de Spearman, $\rho=0.87$), como se muestra en la **Figura 23**.

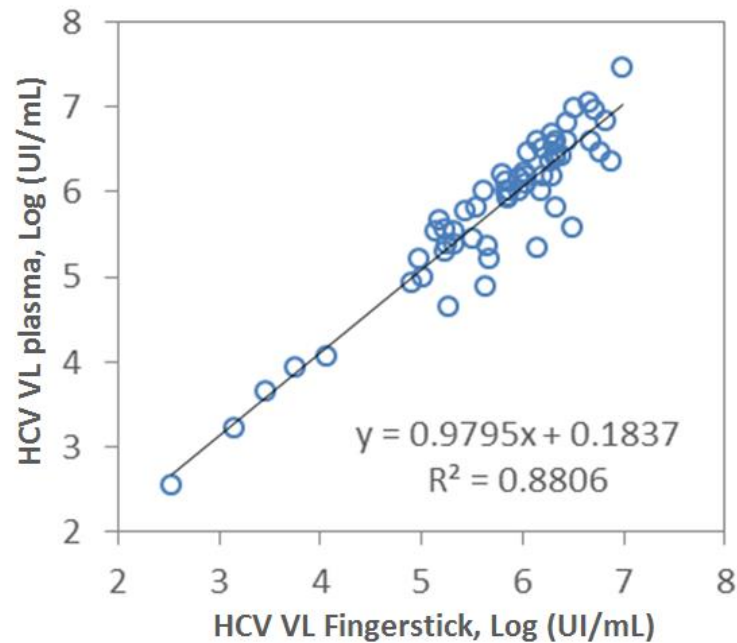


Figura 23. Correlación entre las cargas virales obtenidas por los ensayos Xpert® en plasma y sangre capilar (Fingerstick). UI: Unidades Internacionales

El diagrama de Bland-Altman (**Figura 24**) mostró un sesgo de -0,0659 Log (IU/mL) del ensayo Xpert FS respecto al método de referencia (IC del 95%: -0,69898-0,56718), lo que indica cargas virales ligeramente inferiores con el XpertFS en comparación al ensayo basado en plasma. Cuatro muestras superaron el límite superior de concordancia, con una carga viral más alta detectada por el ensayo Xpert FS que por el método de referencia. Cabe destacar que, si bien el volumen de sangre capilar necesario (100 μ l) se recoge mediante una Minivette de esa capacidad, es posible que a veces el volumen de sangre recogido no sea exactamente de 100 μ l debido a diversos motivos (p.ej. que no se rellene totalmente por dificultades en la recogida de la muestra), lo que puede dar lugar a la variabilidad observada cuando se comparan los

resultados con la prueba de plasma, donde el volumen necesario (1000 µl) se dispensa con una micropipeta con mayor precisión.

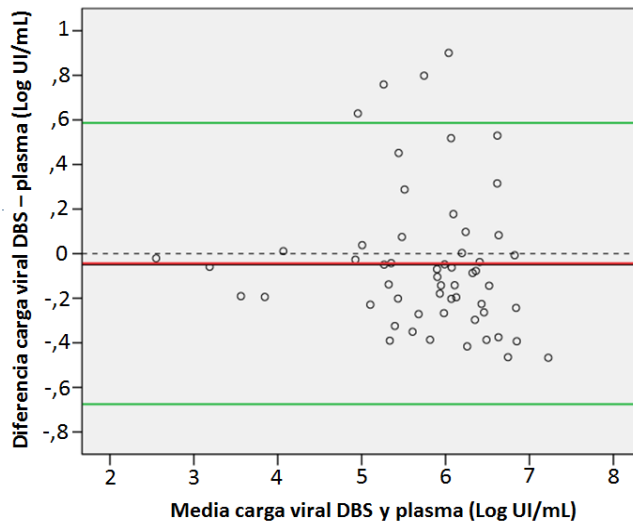


Figura 24. Representación de la diferencia de entre las cargas virales obtenidas por los ensayos Xpert® en sangre capilar y en plasma. UI: Unidades Internacionales.

En el **Artículo II** se evaluó la viabilidad de un ensayo PoCT para la detección del RNA-VHC en un contexto de práctica real en CRD de Cataluña, en el que el 11,5 % de las pruebas tuvieron que ser repetidas. Esta cifra es superior a la observada en un estudio australiano realizado en clínicas de tratamiento de la drogodependencia y servicios de atención a personas sin hogar, en el que se documentó un 8 % de pruebas inválidas (152). En el estudio mencionado, no obstante, el ensayo era realizado por el propio equipo investigador, y no por el personal del centro como en el presente estudio, el cual se formó específicamente para este proyecto (no tenía experiencia previa en técnicas de laboratorio). Otro factor que pudo influir en algunos resultados inválidos es la presencia de sangre coagulada en la pipeta con la que se recoge la sangre capilar, que puede suceder aun cuando ésta contiene anticoagulante.

En otro estudio llevado a cabo en Tanzania en un centro de tratamiento de la drogodependencia, la tasa de error del ensayo Xpert FS fue del 42%, la mayoría debido a una falta de volumen de la muestra. En este, la muestra de sangre recogida era transportada desde el centro de extracción hasta un laboratorio centralizado donde hacían la prueba en el GeneXpert, por lo que los autores hipotetizaron posibles problemas en la toma de la muestra y estabilidad durante el envío, en un país con una temperatura y grado de humedad muy elevadas (227).

Aunque el ensayo Xpert FS está diseñado para su utilización por personal sin experiencia previa en técnicas de laboratorio, el porcentaje de error observado tanto en el presente como en otros estudios indica la necesidad de capacitación del personal que realiza la técnica para asegurar la calidad del proceso (228).

En el estudio llevado a cabo en Australia (152), el ensayo Xpert FS mostró un excelente rendimiento tanto para la detección del RNA-VHC (sensibilidad y especificidad del 98,3% y 100%, respectivamente) como para la cuantificación de la carga viral (sensibilidad y especificidad del 100% con un punto de corte de ≥ 12 IU/mL). A pesar de que utilizaron como técnica de referencia el ensayo HCV *Realtime* de Abbott, que tiene un LID ligeramente superior (12 IU/mL) al del ensayo Xpert VL (10 IU/mL) utilizado en el **Artículo II**, se obtuvieron resultados muy similares a los observados en el presente estudio (sensibilidad del 98,4% y especificidad del 100%). En el estudio australiano también se detectó un falso negativo en una muestra con carga inferior a la detectable por el ensayo de referencia (152).

Asimismo, el estudio realizado en Tanzania también reportó una excelente sensibilidad y especificidad (del 99,1% y 98,7%, respectivamente) (227). En este, los autores documentaron un caso de infección virémica detectada por el ensayo Xpert FS y con un resultado negativo por el Xpert VL, aunque los autores no pudieron sacar conclusiones ya que no fue posible repetir los ensayos de la muestra en concreto.

En concordancia con los estudios de Lamoury *et al.* (152) y Mohamed *et al.* (227), la diferencia entre las cargas virales de VHC detectadas por el Xpert FS y los ensayos de referencia fueron mínimas (-0,07 Log(IU/mL en el presente estudio y en Lamoury *et al.* (152) y -0,13 Log(IU/mL en el estudio llevado a cabo por Mohamed *et al.* (227).

Comparación entre el rendimiento diagnóstico del PoCT molecular (Xpert FS) y la detección del RNA-VHC en DBS. La recogida de DBS fue adecuada en todas las muestras. En ningún caso se observó cambios en el indicador de humedad, y la cantidad de sangre (diámetro y número de los *spots*) fue adecuada en todos ellos. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante una media de 18,2 días (DE; 9,5 días) antes de procesarse en lotes.

Los resultados de cada una se compararon con los de la misma técnica de referencia (Xpert VL en plasma) para diferentes puntos de corte de carga viral (**Figura 25**). Para todas las muestras con carga viral detectable por la técnica de referencia, la sensibilidad fue del 93,7% para el DBS frente al 98,4% del Xpert FS, mostrando una concordancia muy buena entre ambos métodos (Kappa = 0,916). Para los resultados con carga viral cuantificable, considerando los puntos de corte de ≥ 10 IU/mL y 3.000

IU/mL, tampoco se detectaron diferencias significativas entre las dos técnicas. En todos los casos la especificidad fue del 100%. En cuanto a los resultados inválidos, en dos casos de DBS (2,0%) se obtuvo un resultado inválido que se resolvió al volver a realizar la técnica, frente al 11,5% del ensayo Xpert FS.

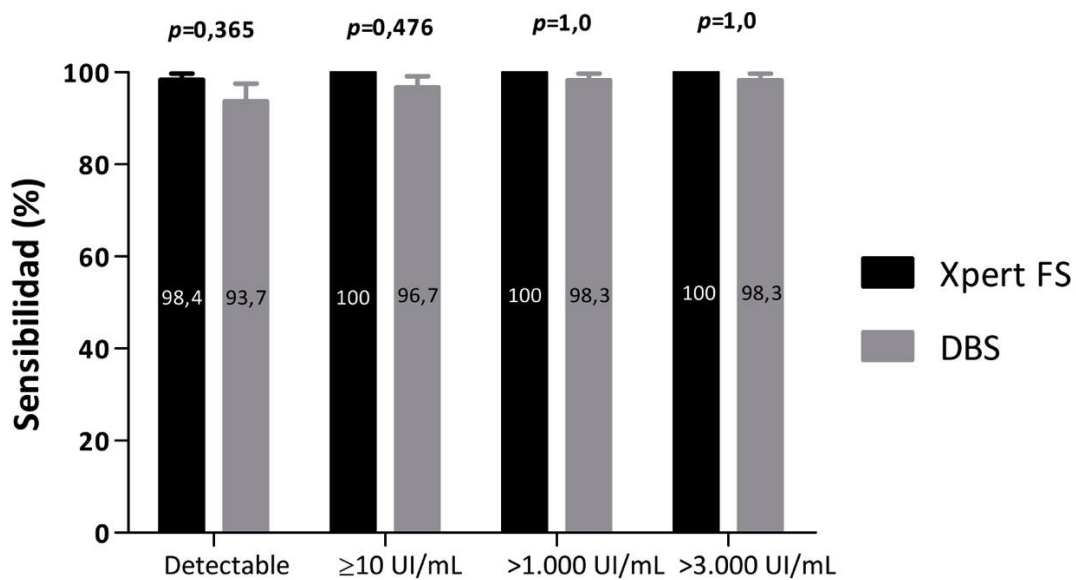


Figura 25. Sensibilidad de los ensayos Xpert FS y DBS en comparación con la técnica de referencia.

Este es el primer estudio que compara el rendimiento de la detección del RNA-VHC por el ensayo Xpert FS con la detección en muestras mínimamente invasivas (DBS). A pesar de la menor sensibilidad de la técnica basada en DBS (LID: 541 IU/mL en sangre total (1) en comparación con el ensayo Xpert FS (LID, 40 IU/mL), la diferencia en el número de casos virémicos identificados no fue significativa (para cualquiera de los tres puntos

de corte de carga viral considerados; detectable, cuantificable ≥ 10 UI/mL y cuantificable > 3.000 UI/mL). La no detección de cargas virales no cuantificables o cargas virales bajas por ambos ensayos supone un bajo impacto en el diagnóstico de la infección virémica, ya que en la mayoría de casos los pacientes presentan cargas más altas. En un meta-análisis reciente se estableció que un ensayo diagnóstico con un LID de 1.316 UI/mL sería capaz de detectar el 97% de los casos virémicos (217). Además, tanto la EASL (125) como la OMS (214) establecen LID alternativos de 1,000 y 3,000 UI/mL, respectivamente, en situaciones específicas (como en regiones de baja y media renta o en poblaciones como los PQID), si con ello se promueve el acceso al diagnóstico.

Efecto del genotipo del VHC y la infección por el VIH en el rendimiento de la detección del RNA-VHC con los ensayos Xpert FS y DBS. Los dos participantes con cargas virales < 10 UI/mL en plasma (2/63, 3,2%) no pudieron ser genotipados por ninguno de los métodos utilizados. En los casos restantes, el genotipo se asignó por secuenciación Sanger seguido de análisis filogenético, excepto en un caso en que se utilizó el ensayo Abbott HCV Genotype II debido a una baja carga viral (1.650 UI/mL). Los genotipos y subtipos del VHC identificados fueron los siguientes: 3a ($n=31$; 50,8%), 1a ($n=24$; 39,3%), 1b ($n=2$; 3,3%), 4a ($n=2$; 3,3%), y 4d ($n=2$; 3,3%). Como solo se obtuvo un resultado falso negativo con el ensayo Xpert FS en uno de los dos participantes con carga viral muy baja que no pudieron ser genotipados, no se pudo identificar ningún efecto del genotipo/subtipo del VHC en la sensibilidad de la técnica.

Por otra parte, los dos participantes con cargas virales <10 UI/mL no fueron detectados por la técnica realizada en DBS (falsos negativos). En los dos casos restantes en que el DBS no detectó el RNA-VHC y se pudo genotipar el virus, los dos se clasificaron como subtipo 3a. No obstante, la no detección por la técnica en DBS seguramente fue debida a las cargas virales presentes en ambas muestras (364 y 4.530 UI/mL en plasma, respectivamente), ya que por otra parte sí se detectaron todas las demás muestras con subtipo 3a (rango de cargas virales: $1.650 - 2,9 \times 10^7$ UI/mL).

Del mismo modo, no se pudo observar ningún efecto de la coinfección por el VIH en los resultados cualitativos del ensayo Xpert FS ni del ensayo basado en las muestras de DBS; la prevalencia de la infección por VIH fue similar en los casos positivos y negativos de RNA-VHC, tanto en el ensayo Xpert FS como en DBS: 25,8% (16/62) vs. 25,0% (15/60), $p=0,733$ y 29,0% (11/38) vs. 30,0% (12/40), $p=0,583$.

Entrega de los resultados del ensayo Xpert FS. Entre los 100 participantes, el resultado del ensayo Xpert FS se entregó al 100% de los participantes después de recibir un incentivo económico, y en el 80% de los casos se entregó el mismo día de la prueba. En los 20 casos en los que el resultado se notificó en un día diferente, tuvo lugar entre 1 y 8 días más tarde (mediana: 3 días). Entre los 11 participantes para los cuales fue necesario repetir la prueba, ocho (72,7%) recibieron el resultado de Xpert FS el mismo día de la prueba, mientras que en los que no hubo problemas en la técnica ($n=89$), el 80,9% recibieron el resultado el mismo día ($p=0,765$).

La derivación a la atención médica se llevó a cabo en todos los casos que requerían tratamiento de la hepatitis C y no estaban en seguimiento (62/63 casos virémicos, 98,4%). Con respecto al resultado confirmado por el método de referencia (Xpert VL), este estuvo disponible al siguiente día laborable y se pudo entregar a todos los participantes en una segunda visita al CRD (mediana: 7 días; rango intercuartílico (RIC): 5-11 días).

Estos resultados de un estudio en vida real demuestran que la entrega de los resultados del nuevo ensayo Xpert FS en el mismo día es viable. Este es el primer estudio en evaluar la entrega de los resultados del ensayo Xpert FS, que pudo llevarse a cabo en todos los participantes, y en el mismo día de la prueba en el 80% de los casos. Estos datos mejoran los observados en el **Artículo I**, en los que se pudo entregar el resultado del RNA-VHC en el 76% de los PQID con infección virémica diagnosticados a partir de muestras de DBS y en un plazo de tiempo más largo. Como resultado de la presente intervención, se diagnosticaron 34 nuevas infecciones virémicas por VHC (54,8% del total de participantes virémicos), que no eran conscientes del propio estado frente al VHC, y el 98,4% de los casos virémicos que no estaban previamente vinculados al sistema sanitario fueron derivados.

Cabe señalar que el incentivo económico se ofreció en el momento de entrega de los resultados; por lo tanto, los estudios posteriores deberán evaluar la tasa de entrega de los resultados en circunstancias diferentes. En un estudio que se está llevando a cabo actualmente en PQID en activo del mismo CRD A (220) en el que se evalúa una estrategia descentralizada de diagnóstico y tratamiento *in situ*, solo el 46% de las PQID

aceptaron el cribado del VHC sin recibir remuneración económica, por lo que será necesario valorar estrategias para aumentar las tasas de diagnóstico.

Cuando se preguntó a los participantes sobre sus preferencias en cuanto a la entrega de resultados (**Figura 26**), el 50,0% de los participantes prefirió recibir el resultado el mismo día aunque tuviera que esperar una hora, el 13,0% prefirió recibir los resultados otro día (diferente al de la prueba), y el 37,0% no expresó ninguna preferencia. Cuando se tuvo en cuenta el conocimiento del propio estado frente al VHC, el 59,4% de los que desconocían su estado (fuera virémico o no) preferían recibir los resultados el mismo día vs. el 33,3% de los que sí eran conscientes de su estado ($p=0,012$). Cuando se consideraron solo los participantes virémicos, esta proporción fue del 58,8% vs. el 34,5%, respectivamente ($p=0,054$). La proporción de PQID que prefirieron recibir el resultado de RNA-VHC el mismo día fue menor a la observada en el estudio de Bajis *et al.* (63%) (209).

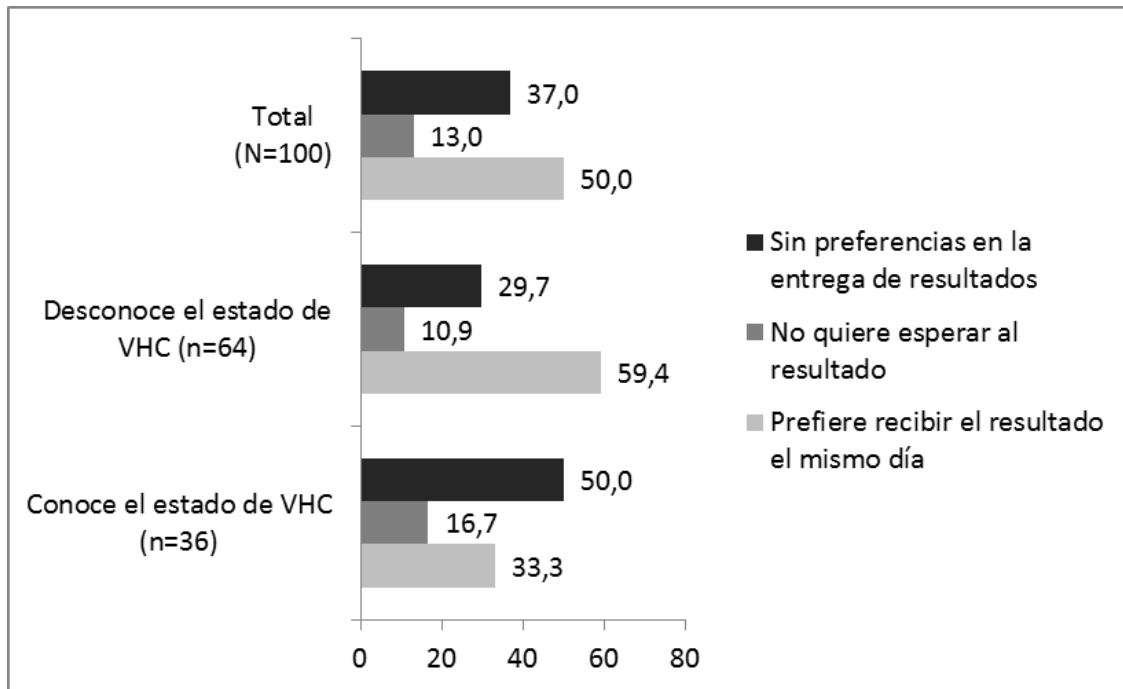


Figura 26. Preferencias de los participantes en cuanto a la entrega de los resultados del RNA-VHC.

Dada la elevada aceptabilidad y fiabilidad de los dos ensayos basados en la obtención de sangre capilar en PQID (PoCT y DBS), los datos observados en el presente estudio muestran la posibilidad de implementar ambas estrategias basadas en la detección directa del RNA-VHC en esta población (150). La simplicidad de la recolección, almacenamiento y transporte de las muestras de sangre seca en DBS a los laboratorios centralizados, ofrecen una alternativa útil y fiable para mejorar el acceso al diagnóstico en PQID que acuden a CRD (191), especialmente en situaciones en las que la instalación del equipo GeneXpert para la realización del ensayo Xpert FS no sea viable. Este equipo tiene requerimientos de espacio, suministro de energía, conectividad a Internet para la validación remota de resultados y disponibilidad de personal capaz de

realizar las pruebas. Por otra parte, el ensayo en DBS requiere la centralización de la prueba en un laboratorio de referencia, así como una segunda visita al CRD, lo que puede suponer pérdidas de seguimiento de los PQID, como se observó en el **Artículo I** en los casos en que no fue posible entregar los resultados de la prueba del RNA-VHC en DBS. No obstante, el hecho de obtener los resultados en la siguiente visita podría no ser una barrera para las PQID que son usuarios regulares del CRD, especialmente si ya son conscientes de su estado de enfermedad virémica, en los que la estrategia basada en el DBS sigue evitando la necesidad de asistir a centros de salud ordinarios, así como de someterse a la flebotomía para realizar las pruebas, lo que puede constituir una barrera para el diagnóstico del VHC en esta población debido al difícil acceso venoso que suelen presentar (229).

En conclusión, el ensayo Xpert FS para la detección y cuantificación del RNA-VHC constituye una herramienta valiosa para la descentralización del diagnóstico del VHC en PQID que asisten a CRD. Además, en los centros en que no sea posible la realización del ensayo Xpert FS, la utilización de muestras mínimamente invasivas (DBS) es una alternativa viable. En consonancia con nuestros resultados, la Sociedad Española para el Estudio del Hígado expresó en un documento de posicionamiento publicado en 2019 que para alcanzar la eliminación de la hepatitis C en España, el diagnóstico descentralizado (que incluye el uso de ensayos basados en DBS o de tipo PoCT para la detección del RNA-VHC) debería promoverse en poblaciones marginales que rara vez acuden a los servicios sanitarios formales, como las PQID (230), lo que también contribuiría a reducir las presentaciones tardías de la enfermedad (231). Por lo tanto,

las dos estrategias ayudarían a reducir potencialmente el número de individuos que no alcanzan un diagnóstico confirmatorio y, en consecuencia, aumentaría el número de PQID con hepatitis C que son conscientes de su estado y que pueden ser vinculados al tratamiento. La implementación de ambos ensayos, no obstante, requiere establecer programas para garantizar la calidad del proceso (195). Los resultados observados en los estudios en vida real descritos en el **Artículo I y Artículo II** han sido fundamentales para orientar los esfuerzos hacia la eliminación del VHC en los PQID en el contexto del Plan de Prevención y Control de la Hepatitis C en Cataluña (99); dentro de este plan se ha aprobado en 2020 un protocolo para el diagnóstico y tratamiento del VHC en centros de atención y seguimiento de las drogodependencias, que ya incluye el GeneXpert y el DBS como alternativas a la analítica convencional tanto para el diagnóstico como para seguimiento del tratamiento y la reinfección del VHC en aquellas ocasiones en las que no se puedan realizar extracciones de sangre venosa (232).

3.2. Caracterización de la epidemia de infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña.

3.2.1. Estimación de la prevalencia por VHC en la población de estudio (Artículo I)

La seroprevalencia de la infección por VHC observada en las PQID que participaron en el estudio *HepCdetect II* fue del 79,8% (327/410; IC 95%: 75,6-83,4%), mientras que la prevalencia de infección virémica fue del 58,5% (235/402; IC 95%: 53,6-63,2%). Del total de participantes virémicos, el 6,4% ($n=15$) de los PQID tuvieron un resultado negativo en la prueba rápida de anticuerpos (seis de ellos con una infección por el VIH). De estos, cuatro individuos fueron clasificados como infección aguda (se confirmó la ausencia de anti-VHC en muestras de plasma y se excluyó la coinfección por VIH). Cinco casos fueron clasificados como falsos negativos de la prueba rápida de anticuerpos (fueron detectados en muestra de plasma). En el resto de individuos ($n=6$) no se pudo llevar a ninguna conclusión debido a que la muestra de plasma no estaba disponible, aunque tres de ellos reportaron haber tenido un diagnóstico previo del VHC. Teniendo en cuenta todos los participantes que fueron o bien positivos para anticuerpos o bien para el RNA-VHC, un 83,8% (337/402; IC 95%: 79,9-87,1%) de los participantes había tenido una infección por el VHC.

Un 24,3% de los participantes con infección virémica por el VHC presentaba coinfección por el VIH. La prevalencia de infección virémica por VHC entre los PQID VIH-positivos y VIH-negativos no mostró diferencias significativas (60,0% vs. 58,0%, $p=0.727$). En global, la prevalencia de infección por VIH a partir de la información auto-

declarada o por la prueba rápida fue del 23,4% (IC 95%: 19,6–27,7%), siendo más frecuente entre los PQID con >5 años de inyección (27,7% vs. 7,1%).

La prevalencia de infección virémica en PQID activos que acuden a CRD de Cataluña (58,5%), fue descrita por primera vez en el estudio *HepCdetect II*. Ésta se sitúa dentro de las tasas más altas observadas en Europa occidental en un meta-análisis reciente (media: 39,9; rango: 19,4 (Serbia); 65,8 (Portugal)) (178). Además, la seroprevalencia observada fue significativamente superior a la reportada por Folch *et al.* (79,8% vs. 65,8%, $p < 0,0001$) en una muestra transversal del estudio bio-conductual REDAN realizada en 2014-2015 en PQID que acudían a CRD de Cataluña (233). Dos factores pueden haber influido en las diferencias observadas entre los dos estudios; por una parte, el periodo de estudio (2016-2017 en el presente estudio y 2014-2015 en el estudio REDAN); y por la otra parte, el uso de una prueba de anticuerpos más sensible en el presente estudio respecto al utilizado en el trabajo de Folch *et al.* (RDT en sangre capilar con una sensibilidad del 97,6% (147,149) frente a un inmunoensayo enzimático en fluido líquido oral con una sensibilidad del 86,7% (234), son factores que podrían explicar las diferencias observadas entre ambos estudios.

Por otra parte, la prevalencia de anti-VHC a partir de muestras de fluido oral en el último estudio bio-conductual REDAN en PQID usuarios de CRD en 2019 fue del 74% (C. Folch, comunicación personal), similar a la observada en el estudio *HepCdetect II* (2016-2017). En el estudio REDAN del 2019 también se observó una tendencia creciente de seroprevalencia en el periodo 2008-2019 dentro del grupo de PQID que se inyectaban drogas desde hacía menos de cinco años (de 55,7% en 2008 a 68% en

2019), hecho que se reflejará también en el apartado 3.2.6, en el que las PQID más jóvenes (< de 30 años) y los inyectores recientes son más susceptibles a tener una infección aguda y pertenecer a un *cluster* de transmisión. En la cohorte de PQID del CRD-A a partir de la cual se validó la técnica de Xpert FS (reclutamiento entre 2018-2019) (**Artículo II**), la seroprevalencia del VHC fue del 89,0% (IC al 95%: 81,4-93,7%), y el 63,0% (IC al 95%: 53,2-71,8%) tenían una infección virémica, similar a lo observado en el CRD-A en el estudio *HepCdetect II* (en este centro la seroprevalencia fue del 83,6% y la prevalencia de infección activa del 67,3%) (**Artículo I**). Todo ello indica que, aunque existe una estructura de servicios de reducción de daños que atiende a las PQID en Cataluña, es necesario darle un nuevo enfoque que incentive el diagnóstico de la infección virémica del VHC y la vinculación al tratamiento, hasta el momento insuficiente. En el futuro habrá que evaluar el impacto de estrategias de micro-eliminación en este colectivo, como el llevado a cabo por el equipo de la Dra. Sabela Lens (Hospital Clínic de Barcelona) en el CRD-A a través de un programa de diagnóstico y tratamiento *in situ* (220), así como la implementación de nuevos circuitos que faciliten el *continuum* asistencial en esta población.

Evaluación del conocimiento del propio estado de infección virémica por VHC en la población de estudio. La proporción de los participantes del estudio *HepCdetect II* que desconocían tener una infección virémica (RNA-VHC en DBS) se calculó a partir de aquellos que respondieron “no” o “no lo sé” a la pregunta “¿tienes hepatitis C?”, dividido entre el total de individuos con infección virémica. También se evaluó el desconocimiento de la infección por VIH a partir de aquellos que contestaron

“negativo” o “no lo sé” a la pregunta “cuál fue el resultado de tu último test de VIH?”, dividido entre todos los individuos con resultado positivo por el test rápido.

No fue posible estudiar el grado de desconocimiento del propio estado de infección virémica por VHC en el 9,8% (23/235) de los participantes virémicos (no se obtuvo contestación a las preguntas del cuestionario antes referidas). En total, el 35,8% (76/212) de las PQID desconocía tener una infección virémica (fueron, por lo tanto, nuevos diagnósticos). En comparación, solo el 8,3% (8/96) de los participantes con resultado VIH positivo desconocían tener la enfermedad. Los resultados del análisis de regresión logístico uni y multivariado de los factores asociados con el desconocimiento de la infección virémica por VHC se muestran en la **Tabla 3** del **Artículo I**. En el análisis de regresión logística univariado el origen extranjero y el reportar ≤ 5 años de uso inyectado de drogas (inyección reciente) se asoció significativamente al desconocimiento de la infección virémica, mientras que el consumo de cocaína como principal droga inyectada en los últimos seis meses, estar en tratamiento para la drogodependencia y tener una coinfección por VIH se asoció negativamente (es decir, se asoció con un mayor conocimiento de la infección virémica). No obstante, ninguna de estas variables fue identificada como factor independiente en el análisis de regresión logística multivariada.

Asumiendo que la población de PQID que atiende a CRD en Cataluña era de 6.000 personas en 2017, estimamos que alrededor de 1.257 PQID no eran conscientes de su infección virémica, y, por lo tanto, estaban a riesgo de contagiar la enfermedad a otros individuos y de que su enfermedad hepática progresara, ya que no estaban siendo

considerados para tratamiento antiviral. La diferencia respecto el VIH también se evidenció en las tasas de tratamiento de las dos infecciones; un 33,1% de los pacientes con infección virémica por VHC recibió tratamiento en alguna ocasión, frente al 79,1% del VIH. Además, entre aquellas PQID que alguna vez recibieron tratamiento frente al VHC, solo un 10% era RNA-VHC negativo, lo cual implica reinfección o fallo terapéutico.

El conocimiento de la infección virémica por VHC es el primer paso a la vinculación al sistema sanitario, y está asociado a la disminución de las conductas de riesgo en las PQID (124), como el *serosorting* (definido como un tipo de medida en la cual el individuo realiza conductas de riesgo o no, como compartir material de inyección o llevar a cabo prácticas sexuales de riesgo para la infección del VHC, dependiendo del estado serológico del compañero/s, con el objetivo de reducir el riesgo de adquirir o transmitir el virus) (235).

A pesar de no permanecer como factores asociados en el análisis multivariado, los inmigrantes (46,0%) y los inyectores recientes (51,5%) tenían un mayor grado de desconocimiento del propio estado de infección virémica. Los inmigrantes constituyen una población vulnerable a las enfermedades infecciosas debido a su exposición en el lugar de origen, durante el traslado y en el lugar de destino, a consecuencia de factores como la falta de acceso a la asistencia sanitaria o las condiciones socio-sanitarias (236). Por otro lado, los inyectores recientes son una población clave en la monitorización de las infecciones por transmisión parenteral. Este grupo se ha relacionado con prácticas de riesgo para las infecciones transmitidas por vía parenteral como el VHC y el VIH, como compartir jeringas u otro material de inyección, el consumo de cocaína y de

varias drogas a la vez, la coexistencia de enfermedades de transmisión sexual y el sexo sin protección, o el intercambio de sexo por dinero, entre otros (237,238), además de presentar un riesgo mayor de transmitir la enfermedad a otros individuos (54,55) y tasas de tratamiento más bajas respecto a las PQID que llevan más años consumiendo drogas (239).

El tratamiento de la drogodependencia constituye, junto al PIJ, las dos principales herramientas de prevención primaria para el VHC en PQID. Los usuarios que recibían tratamiento de la drogodependencia tenían mayor conocimiento de la infección virémica, lo que evidencia la importancia de este programa en la vinculación al sistema sanitario, y, en consecuencia, en la tasa de diagnóstico y tratamiento (175,186,190). El tratamiento de la drogodependencia también se asoció positivamente al conocimiento de la exposición previa por VHC (basado en la prueba de anticuerpos) en un estudio realizado entre 2008-2012 por Parés-Badell *et al.* en PQID que acudían a CRD de Cataluña (240). Además, el tratamiento para la drogodependencia se asoció positivamente a estar diagnosticado y a haber empezado tratamiento para el VHC en un meta-análisis reciente (241).

A su vez, las PQID con una coinfección por el VIH tenían un mayor grado de conocimiento de la infección virémica por VHC (29,4%), aunque no permaneció como factor asociado en el análisis multivariado. A pesar de que no se preguntó en el cuestionario, una posible explicación residiría en el hecho que las PQID infectadas por el VIH tienden a estar atendidas por unidades de atención específicas donde se integra el diagnóstico y el tratamiento del VHC (242).

Asimismo, las PQID que consumían cocaína tenían un mayor conocimiento de la infección virémica (31,6%). La cocaína se ha asociado a una mayor incidencia de reinfección tras el tratamiento efectivo del VHC, debido a la mayor frecuencia de inyección asociada a esta droga (243). Aunque pueda parecer paradójico, el presentar factores de riesgo para la infección (como en este caso la cocaína) podría propiciar a un mayor conocimiento de la enfermedad virémica, dado que estos usuarios percibirían un mayor riesgo y serían más propensos a someterse a pruebas con regularidad (240).

Limitaciones del estudio *Hepdetect II* (Artículo I). Este estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, la información bioconductual autodeclarada puede no ser completamente fiable debido a una interpretación errónea, o a la estigmatización. Sin embargo, creemos que este impacto se minimizó debido a que las entrevistas se llevaban a cabo por personal capacitado que trabaja en los mismos CRD, por lo tanto, en un entorno de confianza. En segundo lugar, el ensayo de detección del RNA-VHC basado en DBS no es tan sensible como los ensayos comerciales, lo que podría haber llevado a una subestimación de la prevalencia global de la infección virémica. Sin embargo, los resultados muestran que la estimación obtenida no debería diferir significativamente de la que se habría encontrado si se hubiera llevado a cabo el algoritmo convencional en dos pasos, incluyendo la carga viral en plasma con ensayos comerciales. En tercer lugar, los datos de prevalencia obtenidos en la provincia de Barcelona podrían no ser representativos de todas las PQID que acuden a los SRD en Cataluña. No obstante, en el estudio REDAN (2014-2015) se demostró que no había

diferencias significativas respecto a los datos de seroprevalencia entre las cuatro provincias de Cataluña (233).

En resumen, a pesar de contar con una red de CRD en Cataluña donde se ofrece la prueba de anticuerpos del VHC, se necesita urgentemente expandir el diagnóstico de la infección virémica, la vinculación al sistema sanitario y el tratamiento frente al VHC entre la población de PQID que hace uso de estos servicios. En este sentido, el ensayo basado en DBS permite estimar la prevalencia en la población de estudio de una manera fiable y tiene el potencial de mejorar el acceso al diagnóstico por parte de las PQID que acuden a CDR, así como el conocimiento del propio estado de infección virémica por VHC.

3.2.2. Validación del uso de las muestras de DBS para la estimación de la diversidad genética del VHC (Artículo III).

Se evaluó el uso de muestras de DBS para la estimación de la diversidad genética inter-hospedador (a nivel de genotipo y subtipo) e intra-hospedador (a nivel de cuasiespecies) del VHC, a partir de la comparación de la diversidad en muestras pareadas de DBS y plasma de 16 participantes del estudio *HepCdetect II* (rango de cargas virales: 4,20-6,78 Log(UI/mL)). Para ello, se llevó a cabo una aproximación basada en NGS de un amplicón que cubre 338 pares de bases de la región NS5B del VHC.

En cuanto al análisis de diversidad genética inter-hospedador, todos los resultados de genotipado y subtipado del VHC obtenidos mediante el análisis filogenético de las

secuencias consenso a partir de los datos de NGS (NS5B) de DBS y de plasma fueron concordantes ($n=7$ subtipos 1a, $n=3$ 1b, $n=2$ 3a, $n=1$ 4a, $n=2$ infecciones mixtas 1a/4a, y $n=1$ infección mixta 1a/1b). Además, no se observaron diferencias a nivel de nucleótidos entre las secuencias consenso de las 16 parejas DBS/plasma. Los resultados confirmaron lo observado en otros estudios, en los que se evidenciaba la idoneidad de las muestras de DBS para la identificación del genotipo/subtipo mediante amplificación y secuenciación Sanger de las regiones 5'UTR (244,245) o NS5B (246) en comparación con las muestras de plasma.

Para el análisis de diversidad intra-hospedador, se normalizaron las lecturas (se seleccionaron una media de 4.205 lecturas de todas las muestras; RIC: 4,074-6,822). Los valores del estimador de diversidad intra-hospedador ES no mostraron diferencias significativas entre las muestras de plasma y DBS ($p=0,734$) (**Figura 27**).

Este es el primer estudio que evalúa la utilidad de las muestras de DBS para el análisis de la diversidad genética del VHC a nivel intra-hospedador utilizando NGS. Esta tecnología de secuenciación ha demostrado una mayor sensibilidad para la detección de variantes minoritarias en comparación con las técnicas de clonación y secuenciación Sanger, lo que permite una mejor caracterización de virus con una alta tasa de diversidad genética como el VHC (247,248).

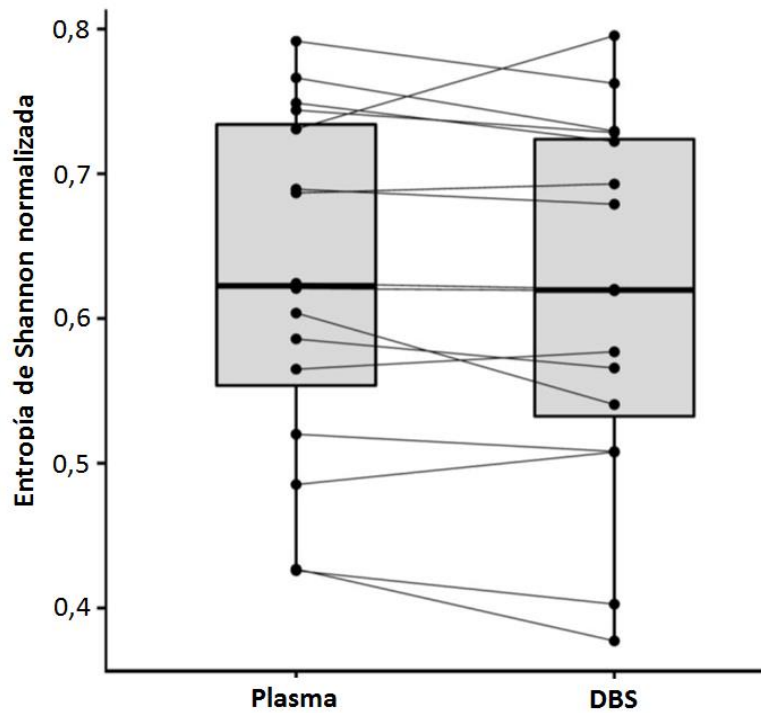


Figura 27. Diagrama de caja y puntos de los valores de ES para las 16 parejas DBS/plasma.

De esta manera, demostramos la utilidad de las muestras de DBS para el estudio de la diversidad inter- e intra-hospedador, a partir de la validación con muestras de plasma, con el objetivo posterior de determinar los genotipos del VHC (diversidad genética inter-hospedador), así como diferenciar las infecciones agudas de las crónicas e identificar *clusters* de transmisión (diversidad genética intra-hospedador) en la población de estudio. Para ello, se llevó a cabo la secuenciación NGS (NS5B) antes mencionada en las muestras de plasma cuando estaban disponibles (participantes CRD A), y en DBS en el resto de CRD (B, C y D).

Características de la población de estudio. El perfil socio-demográfico y conductual de los participantes del estudio de diversidad genética inter- e intra-hospedador se muestra en la **Tabla 1** del **Artículo III**. La mayoría de los participantes eran hombres (85,7%), y el 8,7% tenían ≤ 30 años. Las PQID extranjeros representaron el 30,2% (entre los PQID extranjeros a los que se le hizo NGS, el 39,7% eran de Georgia y el 13,2% de Italia), mientras que el 15,8% eran inyectores recientes (≤ 5 años de uso de drogas inyectadas). Como no se obtuvieron datos de NGS para todos los pacientes con infección virémica (principalmente debido a la dificultad de amplificar mediante PCR la región de interés en aquellos con cargas virales más bajas), se compararon las características socio-demográficas entre aquellos a los que se llevó a cabo NGS y los que no, sin evidenciarse diferencias significativas. Sin embargo, en lo que respecta a conductas relacionadas al consumo de drogas, los individuos no sometidos a NGS reportaron con más frecuencia compartir jeringas ($p=0,024$), practicar *front-loading* ($p=0,028$) y esnifar drogas ($p=0,042$).

Entre los participantes virémicos, el 1,9% (4/265) se encontraban dentro del período ventana de los anticuerpos (RNA-VHC positivo y anti-VHC negativo tanto por la prueba rápida como por el ensayo serológico en plasma). Estos cuatro participantes, todos ellos VIH-negativos, constituyeron los **controles de infección aguda**.

Rendimiento del procedimiento experimental de NGS de la región NS5B del VHC. El circuito de procesamiento de las muestras de plasma y DBS está representado en la **Figura 28**. Se llevó a cabo esta estrategia en muestras de plasma con cargas virales ≥ 10.000 UI/mL (183/203), de acuerdo con resultados preliminares realizados en el laboratorio, en los que la estrategia de amplificación de la región NS5B demostraba ser poco efectiva por debajo de este límite. En total, el 93,4% (171/183) de las muestras se caracterizaron con éxito por NGS. Entre los participantes con infección virémica de los que solo se obtuvieron muestras de DBS ($n=62$), no fue posible llevar a cabo la secuenciación en tres casos por muestra insuficiente. En las muestras restantes, la NGS se realizó con éxito en el 83,1% (49/59) de los casos. Entre las 220 muestras secuenciadas por NGS, la mediana de lecturas tras el filtrado de calidad fue de 10.075 (RIC: 7.675-13.875).

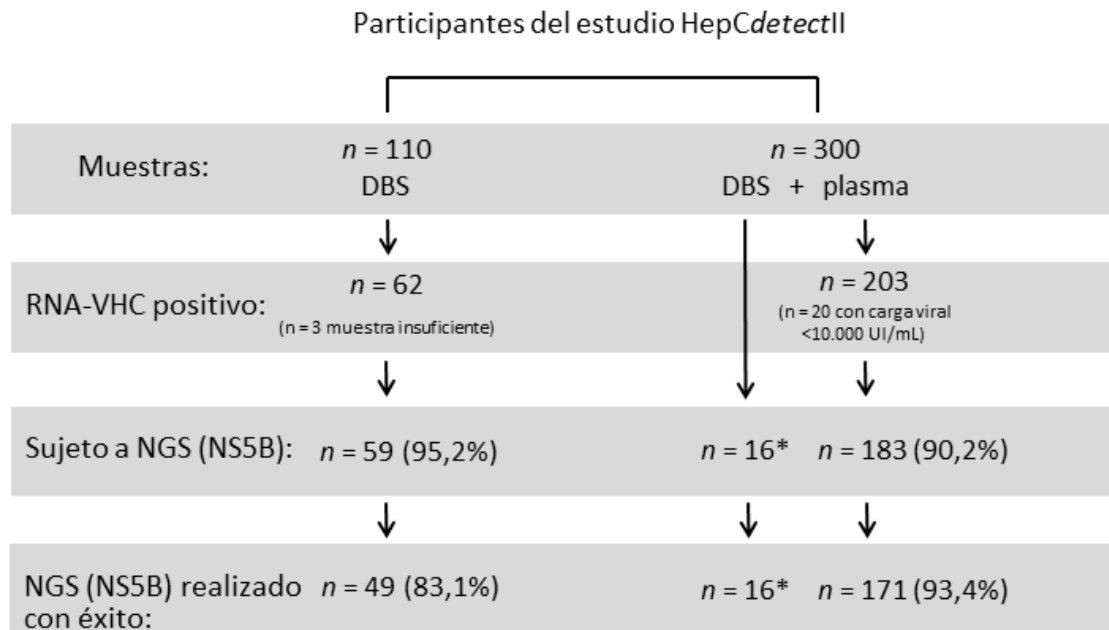


Figura 28. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras de DBS y plasma.

*Muestras pareadas utilizadas para la comparación entre plasma y DBS.

3.2.3. Determinación de los genotipos del VHC circulantes en la población de estudio (Artículo III)

Con el fin de caracterizar la diversidad genética inter-hospedador del VHC (genotipo y subtipo) a partir de los datos NGS, se desarrolló una herramienta *in-house* (HCVGenoTool, disponible en github; <https://github.com/igtp-genbioinfo/HCVgenotool>). Brevemente, la herramienta genera un alineamiento múltiple de todas las lecturas tras el filtrado de calidad junto a un set de secuencias de referencia del VHC, y asigna el genotipo/subtipo mediante análisis de identidad. Los resultados de genotipo/subtipo obtenidos para cada muestra de estudio con la herramienta HCVGenoTool, se compararon con los obtenidos mediante el análisis filogenético a partir de las

secuencias consenso obtenidas a partir de los datos de NGS. Además, se incluyeron dos muestras como controles: una muestra con infección mixta 3a/1b (generada experimentalmente en proporción del 24,0% y 76,0%, respectivamente), y otra con genotipo 5 (por ser un genotipo no representado en las muestras de estudio).

Los resultados de genotipado/subtipado obtenidos con la herramienta HCVGenoTool coincidieron con los obtenidos mediante el análisis filogenético de las secuencias consenso, así como los resultados de los controles (**Tabla suplementaria 1 del Artículo III**). En la **Figura 29** se muestran los porcentajes de los genotipos y subtipos del VHC circulantes en la población de estudio ($n=220$). Se detectaron cinco infecciones mixtas (2,3%): $n=2$ 4a/1a, $n=1$ 1a/1b, $n=1$ 1a/3a y $n=1$ 1a/4d. Entre los participantes nacidos en España, el subtipo 1a predominó (46,0%; 70/152), seguido por el 3a (29,6%; 45/152), mientras que entre las PQID extranjeras el subtipo 3a (42,6%; 29/68) predominó sobre el 1a (25,0%; 17/68) ($p=0,006$).

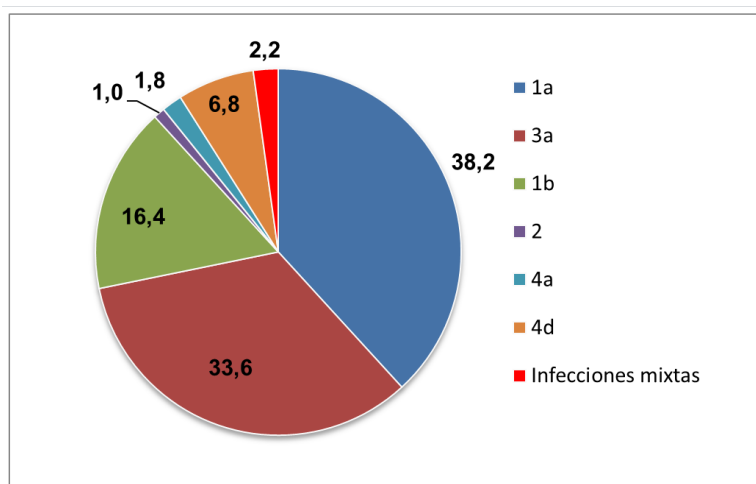


Figura 29. Distribución de genotipos y subtipos del VHC circulantes en la población de estudio.

En la actualidad, la identificación del genotipo/subtipo del VHC sigue siendo necesaria para determinar el régimen de AAD específico de genotipo y la duración del tratamiento en situaciones donde no se disponga de AAD pan-genotípicos, o para optimizar los regímenes de tratamiento con AAD pan-genotípicos, así como para estudios epidemiológicos. Además, se recomienda determinar el genotipo y el subtipo del VHC en algunas regiones de África y Asia y en los migrantes de estas regiones en las que se han observado una alta prevalencia de ciertos subtipos (p.e. los subtipos 1l, 4r, 3b, 3g, 6u o 6v) que presentan polimorfismos que confieren resistencia intrínseca a los inhibidores de la NS5A, lo que da lugar a tasas inaceptables de fracaso terapéutico (128).

La aparición de las técnicas de NGS implicó un avance en la capacidad de caracterizar los genotipos y subtipos, especialmente de identificar posibles infecciones mixtas con variantes minoritarias no detectadas por la secuenciación Sanger o los ensayos de PCR basados en sondas, así como de detectar formas recombinantes y variantes minoritarias asociadas a resistencias al tratamiento (249). No obstante, la secuenciación profunda de amplicones, puede llevar a una identificación errónea de las infecciones mixtas debido a que los cebadores pueden favorecer la amplificación de genotipos o subtipos específicos (144), por lo que es necesario una validación interna de esta metodología. En nuestro caso, los datos obtenidos de NGS de la muestra control de infección mixta mostraron un 38,64% de lecturas asignadas al subtipo 3a y un 61,25% de lecturas al 1b, mientras que la proporción teórica generada era del 24,0% y 76,0%, respectivamente. A pesar de que el proyecto no fue diseñado

inicialmente para la identificación de infecciones mixtas, demostramos que la aproximación llevada a cabo tiene la capacidad de detectarlas en la población de estudio (se detectó en el 2,3% (n= 5/220) del total de muestras analizadas), si bien esta información no puede interpretarse de manera cuantitativa para conocer la proporción de cada subtipo.

El presente estudio destaca por dos aspectos; 1) en cada proceso de secuenciación se corrió una muestra del plásmido control de la región NS5B (de secuencia conocida y detallado en la sección de métodos del **Artículo III**) junto con con las muestras del estudio para cuantificar los posibles errores introducidos durante el proceso de secuenciación, y en base a esto, se introdujo un punto de corte conservador (3% de las lecturas) para definir una infección mixta; y 2) la metodología se validó en un set de muestras procedentes de un colectivo con una incidencia elevada, lo que supone un escenario ideal para valorar las infecciones mixtas. Por lo tanto, tanto la metodología experimental como la herramienta de análisis bioinformático desarrollada en el presente estudio permite la caracterización del genotipo/subtipo del VHC mediante un enfoque simple, y de fácil uso para personal no especializado en bioinformática.

Otros trabajos han desarrollado ensayos para el genotipado y subtipado del VHC basados en NGS, tanto *in-house* como comerciales. Entre estos últimos cabe destacar el ensayo *Roche-Next Generation Sequencing assay* de Roche (procedimiento semi-automatizado) (250,251), y la plataforma totalmente automatizada Sentosa SQ VHC Genotyping Assay (VELA Diagnostics GmbH). Los dos ensayos son capaces de identificar el genotipo y subtipo del VHC basándose en la identidad de la región NS5B,

al igual que en el presente estudio. El ensayo Sentosa SQ VHC Genotyping además detecta resistencias asociadas a los AAD en otras regiones genómicas (145). No obstante, en un estudio en el que se validaba esta última plataforma a partir de un set de muestras de diferentes genotipos y subtipos asignados por secuenciación y análisis filogenético, los autores observaron discrepancias en el subtipo de algunas muestras con VHC genotipo 2 y genotipos 1 diferentes a 1a/b, aunque los autores afirmaban que este hecho podría ser corregido ampliando las secuencias de referencia de la base de datos del ensayo (145).

La distribución de los genotipos/subtipos circulantes fue similar a la observada en PQID un estudio realizado a nivel nacional (86), en el que el subtipo 1a fue predominante en las PQID (38,1% vs. 38,2% en nuestro estudio), seguido por el 3a (26,5% vs. 33,6% en nuestro estudio). El subtipo 3a fue predominante en las PQID extranjeras, lo que concuerda con una revisión sistemática de la distribución global de genotipos en PQID, donde el subtipo 3a fue el mayoritario en PQID de países como Georgia (70,0%) o Italia (39,7%) (252), con una alta representación en el presente estudio (el 39,7% y el 13,2% de las PQID no autóctonas procedían de Georgia e Italia, respectivamente). El genotipo 3 se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (253) , y una menor respuesta a algunos regímenes de AAD (254). No obstante, según un meta-análisis reciente, las tasas de RVS han demostrado ser altas en PQID (255), incluso en las que se han inyectado recientemente y tienen una adherencia irregular al tratamiento (256).

3.2.4. Estimación de la proporción de infecciones agudas por VHC en la población de estudio a partir de los datos de NGS (Artículo III)

El estudio de factores de riesgo asociados a la infección reciente por el VHC es clave para entender la epidemia del virus a nivel local, así como para obtener información con el objetivo de desarrollar estrategias de prevención y tratamiento dirigidas (55). La infección aguda se define como el período que comprende los seis primeros meses posteriores al evento de transmisión (123). Sin embargo, su identificación es difícil debido a que cursa de manera asintomática o con sintomatología inespecífica en la mayoría de los casos, y al valor limitado que ofrecen los marcadores diagnósticos disponibles. Clásicamente, la infección aguda puede identificarse dentro del período de ventana de anticuerpos (las primeras 6-8 semanas tras la exposición) cuando se detecta el RNA-VHC en pacientes seronegativos (257), o cuando se observa una seroconversión en pacientes previamente negativos en estudios longitudinales (123). No obstante, algunos individuos tienen una respuesta inmune humoral retardada o incluso anti-VHC indetectables a largo plazo (258). También se han descrito enfoques alternativos, como la determinación de la avidéz de los anticuerpos contra el VHC, aunque esta puede verse alterada en pacientes inmunodeprimidos, como en las personas con una coinfección por VIH (259,260).

En este sentido, V. Montoya *et al.* demostraron que la diversidad intra-hospedador de la región NS5B del VHC, medida a través del estimador de diversidad ES a partir de los datos obtenidos de la **NGS**, aumenta proporcionalmente con el tiempo de infección, y en consecuencia, tiene el potencial de diferenciar las infecciones agudas de las

crónicas a nivel poblacional incluso después de la seroconversión, pudiéndose utilizar como método alternativo para identificar las infecciones agudas (129,130). De esta manera, la identificación de las infecciones agudas permite estimar la incidencia de infección en estudios transversales, y monitorizar la epidemia del VHC, así como el efecto de las intervenciones de control llevadas a cabo (261).

En el **Artículo III** se evaluó la diferenciación a nivel poblacional de las infecciones agudas (<6 meses de infección) y crónicas (≥6 meses de infección) basándose en los valores de ES obtenidos a partir de los datos de NGS de la región NS5B. La determinación del punto de corte óptimo del valor de ES que permitiera diferenciar con fiabilidad las infecciones agudas de las crónicas, se calculó utilizando un conjunto de controles de infección aguda ($n=11$) y crónica ($n=28$) de un estudio previo de seroconvertidores en Canadá (129), así como otros controles pertenecientes a la población de estudio ($n=4$ agudos y $n=12$ crónicos); con un total de 15 controles de infección aguda y 40 de infección crónica.

A fin de comparar los valores de ES entre los participantes, se normalizó el número de lecturas obtenidas tras el filtrado de calidad en cada experimento de secuenciación masiva llevado a cabo (mediana: 4205; rango: 4074-6822), lo que representó utilizar una mediana del 46,5% de las lecturas (RIC: 35,0% - 61,6%). Se realizó un análisis de sensibilidad para estudiar como variaba la ES respecto al valor obtenido al utilizar el 100% de las lecturas (**Figura 30**), sin observar diferencias significativas respecto al uso de las lecturas normalizadas.

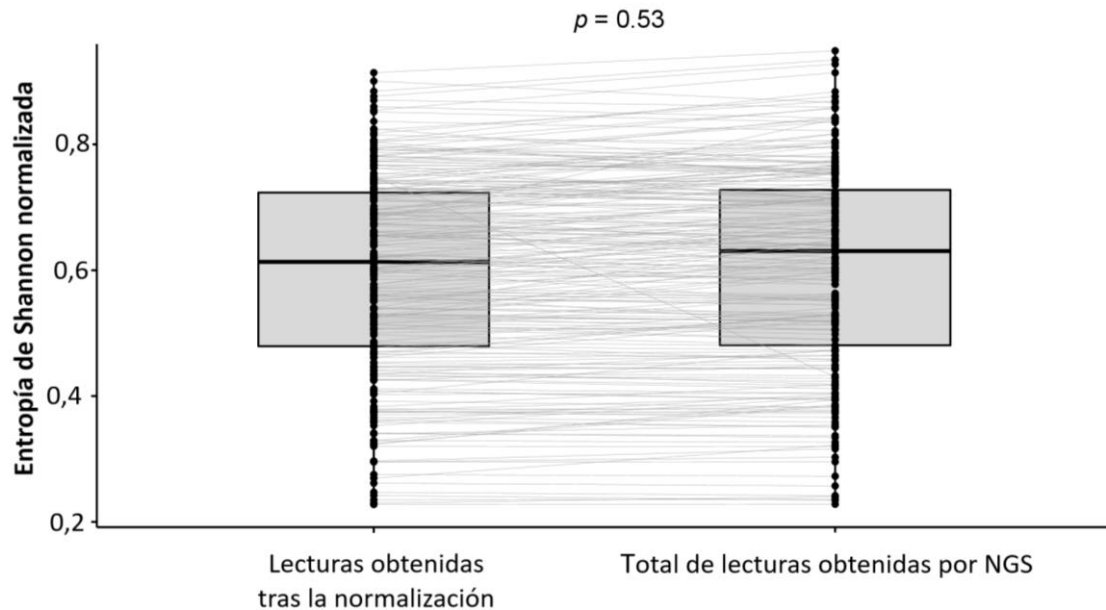


Figura 30. Diagrama de cajas y puntos de los valores de entropía de Shannon utilizando las lecturas normalizadas y el 100% de lecturas obtenidas tras el filtrado de calidad.

A partir del análisis de curva ROC de los valores de ES obtenidos para los controles de infección aguda y crónica, se obtuvo un área bajo la curva ROC (AUROC) de 0,987 (IC 95%: 0,96-1,00) (**Figura 31**). Seleccionando un valor de ES de 0,41040 como punto de corte para diferenciar las infecciones agudas de las crónicas, se obtuvo una sensibilidad del 93,3% (IC 95%: 81,0%-100%), una especificidad del 95,0% (IC 95%: 88,0%-100%), un valor predictivo positivo del 87,5% (IC 95%: 71,0%-100%) y un valor predictivo negativo del 97,4% (IC 95%: 92,0%-100%). Cuando se aplicó este punto de corte a la población de estudio, el 13,5% (29/215) de los participantes se clasificaron

como infecciones agudas. Las cinco infecciones mixtas detectadas fueron excluidas de este análisis, ya que la metodología no había sido validada en este contexto.

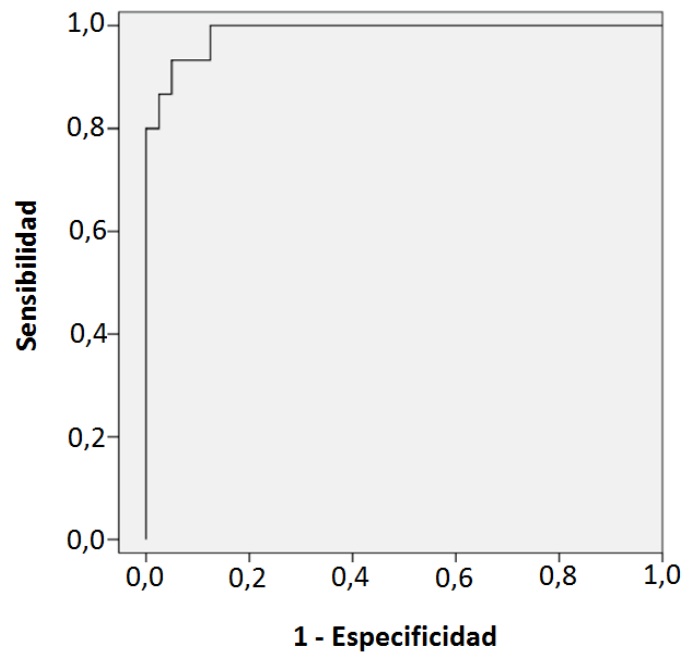


Figura 31. Análisis de curva ROC para la identificación de las infecciones agudas a partir de los valores de ES obtenidos mediante NGS de la región NS5B en los controles de infección aguda ($n=15$) y crónica ($n=40$). AUROC=0.987.

La metodología utilizada en el presente estudio fue capaz de identificar las infecciones agudas de manera fiable (AUROC de 0,99), de acuerdo con el estudio llevado a cabo por Montoya *et al.* (129). En este último, los autores demostraron que el estimador de diversidad inter-hospedador ES aumentaba de manera proporcional después de la infección utilizando modelos lineales mixtos; mediante un análisis de curva ROC, evidenciaron por primera vez que este marcador podía distinguir las infecciones

agudas de las crónicas de forma fiable (AUROC: 0,96), lo que fue validado posteriormente en una cohorte diferente en el presente estudio.

Como novedad, en el estudio HepCdetect II propusimos un valor de punto de corte de ES que permitió diferenciar las infecciones agudas de las crónicas a nivel poblacional con una sensibilidad del 93,3% y una especificidad del 95,0%. La utilidad de la región NS5B para discriminar las infecciones agudas de las crónicas ha sido confirmada en un estudio reciente, en el que la región NS5B demostró tener una mayor capacidad respecto a otras regiones del VHC (130). Mientras que inicialmente solo cuatro participantes con infección virémica (1,9%; 4/265) fueron identificados como infecciones agudas en el estudio HepCdetect II (**Artículo I**), en base a la detección del RNA-VHC dentro del período de ventana de anticuerpos, cuando se utilizó la nueva metodología basada en NGS se identificaron 25 participantes adicionales como infecciones agudas (13,5%; 29/215). La aplicación de esta metodología permitió estimar la incidencia de la infección por VHC en el siguiente análisis.

Estimación de la incidencia de infección por VHC en la población de estudio. La incidencia del VHC es un estimador clave para medir los esfuerzos hacia la eliminación de la hepatitis C. Recientemente la OMS ha propuesto reducir la incidencia del VHC en PQID por debajo de 2 infecciones por 100 personas/año para el 2030, con el objetivo de eliminar la hepatitis C crónica como problema de salud en este colectivo (82). En el **Artículo III**, la incidencia se estimó basándose en la fórmula descrita por Hope *et al.* (261), aplicando una corrección por la tasa de falsos positivos de ES para identificar las

infecciones agudas en el grupo control de seroconvertidores antes mencionado.

$$I = \frac{\left(\frac{365}{T}\right) \times (n - (FP \times n))}{\left[N - (n - (FP \times n))\right] + \left[\left(\frac{365}{T}\right) \times (n - (FP \times n))\right]}$$

En esta ecuación, I representa la incidencia; T es el periodo de tiempo estimado durante el cual el marcador de diversidad genética ES se mantiene por debajo del punto de corte establecido para diferenciar infecciones agudas de crónicas en los controles anteriormente mencionados (para ello se escogieron los valores superior e inferior del RIC observado en el estudio de seroconvertidores; 48 y 155 días, respectivamente); n representa el número de infecciones incidentes (infecciones agudas obtenidas a partir de los datos de NGS); N es el número de personas susceptibles de adquirir la infección (individuos con RNA-VHC negativo y aquellos clasificados como infecciones agudas por NGS, ya que se consideró que al inicio del estudio también eran RNA-VHC negativos); y FP es la tasa de falsos positivos del estimador ES para estimar las infecciones agudas. La incidencia anual estimada del VHC varió de 59 por 100 personas/año (cuando se consideró el valor de 48 días) a 31 por 100 personas/año (cuando se utilizó el valor de 155 días).

Estos valores de incidencia observados son similares a los obtenidos en una cohorte de seroconvertidores del VHC en PQID jóvenes de España (52,9 por 100 personas/año, período 2001-2003) (262), y se encuentran en el rango superior de un estudio llevado a cabo en PQID en varias ciudades de Estados Unidos, Canadá, los Países Bajos y Australia (7-33 por 100 personas/año) (263). En otro estudio realizado en CRD de Barcelona durante el periodo 2010-2011, se estimó una incidencia de 25 por 100

personas/año en inyectores recientes (223). Aunque la metodología que los autores utilizaron para estimar la incidencia (detección de anticuerpos frente al VHC junto a tiempo medio desde el inicio de inyección) no es comparable a la del presente estudio, el hecho de que la incidencia del VHC siga siendo alta en nuestro contexto, donde existen una red estable de servicios de reducción de riesgos, pone en relieve la necesidad de mejorar las medidas de prevención, así como el diagnóstico temprano y las tasas de tratamiento (264). En este sentido, en el **Artículo I** observamos que el 35,8% de las PQID no eran conscientes del propio estado de infección virémica, y que únicamente el 29% con antecedentes de VHC había recibido tratamiento alguna vez. Para disminuir la incidencia y conseguir la micro-eliminación del VHC en este colectivo será necesaria la sinergia entre diferentes medidas de prevención primaria (en especial de los programas PIJ y PMM) y una rápida expansión de la cobertura de tratamiento como herramienta de prevención de la transmisión (*treatment as prevention*) (265).

3.2.5. Identificación de *clusters* de transmisión del VHC en la población de estudio

El análisis filogenético de las cepas circulantes del VHC es una herramienta poderosa para entender la dinámica de transmisión del virus a nivel poblacional a través de la identificación de eventos de transmisión (55,65,266,267), lo que permite inferir redes sociales (268) e identificar a los individuos con mayor riesgo de transmitir la infección (54,55).

Para el estudio de epidemiología molecular dentro del estudio HepCdetect II se utilizaron los datos obtenidos por NGS de la región NS5B del VHC. En un subgrupo de muestras ($n=59$) se amplificó y secuenció mediante Sanger la región Core-E2 como región de referencia, ya que presenta una mayor variabilidad genética que la NS5B. En un estudio llevado a cabo por un grupo australiano, los autores demostraron que la región Core-E2 tenía una longitud y variabilidad genética óptimas, que le confería mayor poder resolutivo para identificar *clusters* de transmisión en estudios poblacionales en comparación con otras regiones del VHC.

El 46,8% (103/220) de los participantes con infección virémica en los que se llevó a cabo la estrategia NGS se identificaron como parte de *cluster* de transmisión. Se observaron 29 *clusters* de transmisión que tenían el siguiente número de personas involucradas y genotipo del VHC: $n=29$, subtipo 1a; $n=9$, subtipo 3a; $n=6$, subtipo 1a; dos *clusters* de $n=4$, uno perteneciente al subtipo 1a y el otro al subtipo 3a; tres *clusters* de $n=3$, dos del subtipo 1a y uno del subtipo 3a; y 21 *clusters* de $n=2$ de los subtipos 1a ($n=7$), 3a ($n=6$), 1b ($n=4$) y 4 ($n=4$) (**Figura 32**). Entre las personas con una infección aguda que pertenecían a un *cluster* de transmisión, el 82,6% (19/23) agrupaban con otro PQID con infección aguda (**Figura 32**). Además, en los individuos con infección aguda, era significativamente más frecuente que formaran un *cluster* con otro caso de infección aguda que en aquellos con infección crónica ($p=0,001$). No hubo evidencia de *clustering* por país de origen, es decir, los *clusters* identificados incluían tanto PQID autóctonas como no-autóctonas.

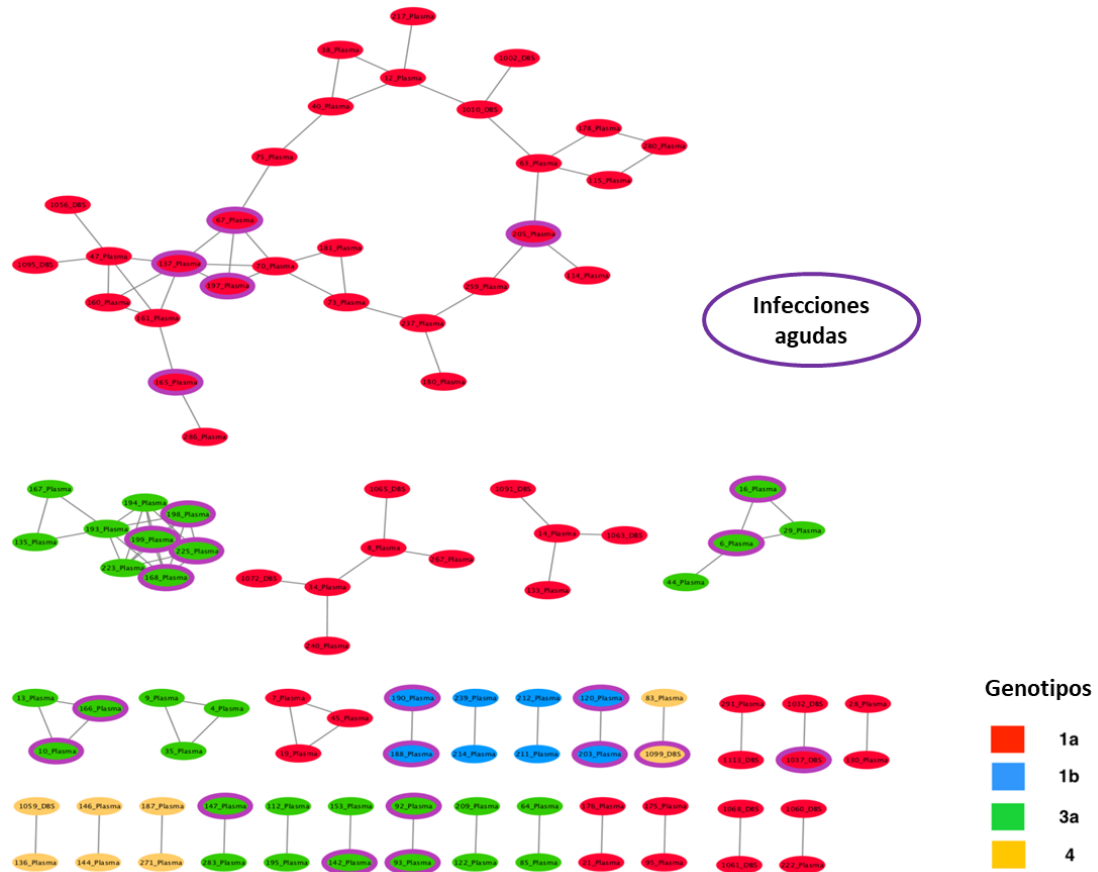


Figura 32. Representación de la red de *clusters* de transmisión identificados en la población de estudio derivados de la filogenia de máxima verosimilitud a partir de los datos de NGS de la región NS5B del VHC. Los genotipos y subtipos identificados se representan en diferentes colores (subtipo 1a, rojo; subtipo 1b, azul, subtipo 3a, verde y genotipo 4, amarillo). Los participantes con infección aguda se identifican con un círculo violeta. Las ramas entre cada nodo se escalan de manera proporcional a las distancias correspondientes en la filogenia de máxima verosimilitud a partir de las secuencias consenso de la región NS5B.

La amplificación y secuenciación Sanger de la región Core-E2 se realizó con éxito en el 71,2% (42/59) de las muestras seleccionadas, las cuales presentaban un rango de carga viral de 4,65-7,37 Log(Ul/mL), y pertenecían a los subtipos 1a ($n=16$), 1b ($n=4$), 3a ($n=18$), 4a ($n=2$) y 4d ($n=2$). El resto de muestras no se incluyeron en el análisis filogenético debido a que no se pudo obtener cromatogramas de suficiente calidad para la interpretación de las secuencias, aunque no se asoció a la carga viral de éstas (todas las muestras presentaban cargas virales por encima de 4 Log(Ul/mL). En este sentido, una posible causa podría deberse a la longitud y elevada variabilidad del fragmento amplificado Core-E2 (1.534 pb). Cuando se compararon los *clusters* identificados por secuenciación Sanger (Core-E2) con los obtenidos mediante NGS (NS5B), el porcentaje de concordancia fue del 85,7% ($\kappa=0,68$; IC 95%: 0,44-0,92). Dos participantes que pertenecían a un *cluster* de transmisión según el análisis de la región NS5B (NGS) no fueron identificados mediante el análisis de la región Core-E2 (Sanger), y cuatro participantes identificados mediante el análisis de Core-E2 no formaron *cluster* según la región NS5B. Estas diferencias pueden ser debidas tanto al diferente poder resolutivo de cada una de las regiones como a que en el análisis filogenético basado en la región Core-E2 se incluyeron menos muestras que en el de la región NS5B, y, por lo tanto, la información de la que partía el análisis filogenético no era la misma, pudiendo afectar a los *clusters* identificados en ambos análisis.

En general, la estrategia llevada a cabo mediante NGS de la región semiconservada NS5B, capaz de detectar variantes minoritarias implicadas en los eventos de transmisión (**Figura 33**), demostró ser comparable a la secuenciación Sanger de la región de referencia Core-E2. Además, la tasa de amplificación y secuenciación de la NS5B fue superior al de la región Core-E2 (93,4% frente a 71,2%), lo que constituye una fortaleza del método utilizado.

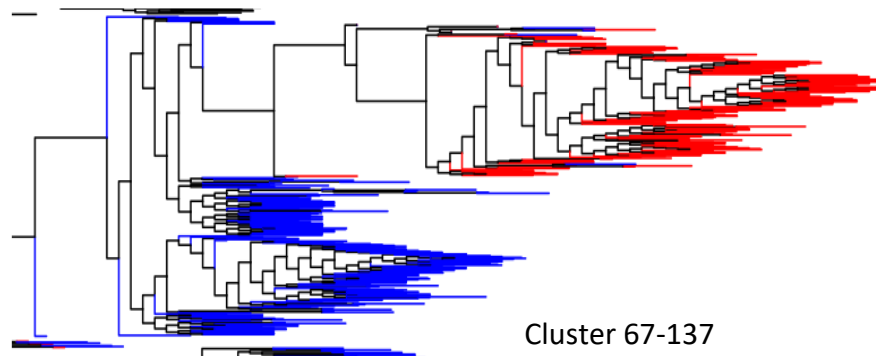


Figura 33. Representación de un *cluster* de transmisión (IDs 67 y 137) identificado en la población de estudio mediante análisis filogenético de máxima verosimilitud a partir de los datos de NGS de la región NS5B del VHC. La imagen muestra como las variantes secuenciadas del ID 137 (color rojo) se intercalan entre las variantes del ID 67 (representadas en color azul) y ambos tienen un origen monofilético.

3.2.6. Identificación de los determinantes de infección aguda y de los *clusters* de transmisión en la población de estudio (Artículo III)

Los análisis llevados a cabo en el **Artículo III** permitieron caracterizar los determinantes de infección reciente, mediante la identificación de determinantes de infección aguda y *clustering* filogenético. En el análisis de regresión logística sin ajustar (**Tabla 2** del **Artículo III**), la infección aguda se asoció a la edad ≤ 30 años, a llevar ≤ 5 años de uso de drogas inyectadas, a compartir rulo para esnifar cocaína, al estar infectado con el subtipo 3a del VHC y a desconocer el estado de la infección virémica por VHC. En el análisis de regresión logística ajustado por edad y tiempo de inyección, la edad ≤ 30 años (AOR=8,09; IC 95%: 1,99-33,33), no inyectarse drogas diariamente (AOR=4,35; IC 95%: 1,99-33,33), ≤ 5 años de uso de drogas inyectadas (AOR=3,43; IC 95%: 1,04-11,32), compartir rulo para esnifar cocaína (AOR=2,89; IC 95%: 1,08-7,75) y desconocer el estado de infección virémica por VHC (AOR=3,62; IC 95%: 1,36-9,62) permanecieron como **factores asociados a la infección aguda por VHC**.

Por otro lado, la edad ≤ 30 años (AOR=6,16; IC 95%: 1,21-31,21), tener una infección aguda por VHC (AOR=5,73; IC 95%: 2,04-16,13) y la infección por el subtipo 1a del VHC (AOR=4,78; IC 95%: 2,56-8,93) se identificaron como **factores asociados a formar parte de un *cluster* de transmisión** en el análisis de regresión logística sin ajustar y ajustado por edad y tiempo de inyección (**Tabla 3** del **Artículo III**).

La infección por los genotipos 3a o 1a se asoció a la infección aguda (análisis univariado) y a formar parte de un *cluster* de transmisión (análisis uni- y multivariado), respectivamente. Este hecho no es sorprendente, ya que estos dos genotipos se han

vinculado históricamente a la transmisión parenteral por inyección de drogas, debido a un crecimiento exponencial en el colectivo de PQID durante la segunda mitad del siglo XX (269), además de haberse relacionado anteriormente como factor asociado al *clustering* filogenético en PQID en Australia (genotipo 1a) (270) y Canadá (genotipo 3a) (267).

La edad ≤ 30 años fue identificada como factor predictor independiente de infección aguda (AOR=8,09) y pertenecer a un *cluster* de transmisión (AOR=5,98). La juventud ha sido previamente reconocida como factor de riesgo de formar parte de un *cluster* de transmisión en un estudio realizado en Canadá en PQID (54). Las PQID más jóvenes se han relacionado con prácticas de inyección de alto riesgo, como compartir jeringas u otro material de inyección e inducir a otros jóvenes a inyectarse drogas por primera vez (271). En este sentido, son necesarias medidas de prevención innovadoras dirigidas a las PQID más jóvenes, con el objetivo de reducir la transmisión entre esta población de riesgo.

Además, se observó que las PQID con infección aguda compartían rulo para esnifar cocaína con mayor frecuencia que aquellas con una infección crónica, pero por el contrario, mostraban menos tendencia a inyectarse drogas diariamente, lo que podría indicar un proceso de transición del uso de drogas no inyectadas al uso parenteral, lo cual suele ocurrir a una edad temprana (272). A pesar de las controversias sobre este tema, la ruta de transmisión intranasal del VHC se ha demostrado a nivel virológico en PQID (73). Las autoridades sanitarias han recomendado el uso de drogas no inyectadas con el objetivo de reducir las infecciones transmitidas por vía parenteral, la

dependencia y la sobredosis (273), pero los resultados observados en el presente estudio destacan la importancia de reforzar la educación también sobre el consumo seguro por vías diferentes a la inyectada.

La asociación de la infección aguda con ≤ 5 años de uso de drogas inyectadas es esperable, ya que la mayoría de las infecciones por VHC en las PQID se producen durante los primeros años de inyección. Como se describió en el **apartado 3.1.2 (Artículo I)**, el 38,3% de las PQID que llevaban menos de dos años inyectándose ya habían tenido contacto con el VHC, alcanzando el 75,0 % en PQID con entre 3 y 5 años de inyección (**Figura 20**).

Además, el desconocimiento de la infección virémica es esperable, teniendo en cuenta que el 35,8% del total de participantes con VHC virémica desconocían el estado de su infección en el estudio HepCdetect II (**Artículo I**). Aumentar el conocimiento del propio estado de infección virémica es el primer paso hacia la vinculación al sistema sanitario y tratamiento, y ha sido relacionado con la disminución de conductas de riesgo para evitar la transmisión a otras PQID (124). En este sentido, la implementación de algoritmos de diagnóstico alternativos (como la estrategia de diagnóstico en un único paso basada en la detección directa del RNA-VHC en DBS analizada en el **Artículo I**) son necesarios para promover el diagnóstico temprano y aumentar el conocimiento del propio estado de infección virémica, y de esta manera reducir la transmisión del VHC entre PQID.

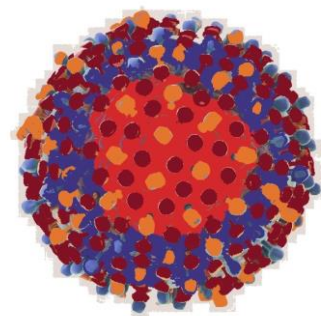
Por otro lado, la infección aguda se asoció a formar parte de un *cluster* de transmisión, de acuerdo con estudios anteriores (54,274). Las PQID con infección aguda también

mostraron una mayor tendencia a estar en el mismo *cluster* con otros PQID con infección aguda que con individuos con infección crónica, lo que sugiere una relación epidemiológica estrecha entre los participantes con infección aguda. Todo ello, sugiere no solo la necesidad de reforzar la prevención y diagnóstico de la infección vírica del VHC, sino de aplicar estrategias de tratamiento precoz en estos individuos, así como en las otras PQID con las que se inyectan (estrategia denominada “*treat a friend*”) (123,125,126,275).

Limitaciones del estudio. En primer lugar, el 8,7% (23/265) de las muestras de los participantes víricos no fueron sometidas a NGS, debido a una carga viral inferior a 10.000 UI/mL en plasma ($n=4$) o a un volumen insuficiente de muestra ($n=19$), y, por lo tanto, no se realizó el análisis filogenético o el estudio de la infección aguda/crónica en estos participantes. Dado que durante la infección aguda los niveles de RNA-VHC pueden experimentar fluctuaciones (221), es posible que algunos de los participantes con cargas virales inferiores a 10.000 UI/mL que no se secuenciaron estuvieran en la fase aguda de la infección, lo que podría llevar a subestimar la incidencia del VHC e influir en el análisis de los determinantes de la infección aguda. De hecho, se observaron ciertas diferencias en cuanto a las conductas relacionadas al consumo de drogas entre los participantes víricos a los que se les hizo NGS de los que no (estos últimos tenían más tendencia a compartir jeringas, practicar *front-backloading*, y esnifar drogas), lo que va a favor de la hipótesis planteada. En segundo lugar, el número relativamente pequeño de infecciones agudas identificadas por NGS puede

haber dado lugar a un poder estadístico limitado para evaluar factores de riesgo asociados. No obstante, la metodología empleada en el **Artículo III** permitió identificar determinantes de infección aguda y estimar la incidencia del VHC en nuestro entorno en un estudio transversal, sin necesidad de realizar estudios longitudinales. Por último, el análisis de los factores asociados a formar parte de un *cluster* de transmisión puede verse limitado por el hecho de que entre un 15 y un 40% de las personas eliminan espontáneamente la infección por el VHC (88), lo que supone un sesgo de selección.

CONCLUSIONES



4. CONCLUSIONES

Validación de nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico de la infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD:

1. La prueba del RNA-VHC, previamente puesta a punto en muestras mínimamente invasivas de DBS, presenta una elevada sensibilidad y especificidad en vida real en PQID.

2. El algoritmo en un único paso de detección directa del RNA-VHC en DBS permite simplificar el diagnóstico de la hepatitis C en esta población de elevada seroprevalencia, y permite centrarse en aquellos individuos con infección virémica para vincularlos a la atención médica y, a la vez, aumentar el número de PQID que son conscientes de su enfermedad.

3. El ensayo tipo PoCT Xpert FS, presenta una excelente sensibilidad y especificidad para la detección y cuantificación del RNA-VHC en muestras de sangre capilar fresca, y su implementación en vida real ha demostrado ser factible en un CRD que dispone de personal de enfermería. Además, permite entregar el resultado el mismo día en el 80% de los casos y aumentar la vinculación a la atención médica en la mayor parte de casos virémicos (98,4%) que no estaban previamente vinculados. 4. La coinfección por VIH y el genotipo/subtipo del VHC no influyen en la detección del RNA-VHC en el ensayo PoCT Xpert FS ni en el ensayo basado en DBS.

4. En CRD donde el ensayo PoCT instrumentado no sea viable, la detección del RNA-VHC en DBS es una alternativa excelente, con el objetivo de descentralizar y facilitar el acceso al diagnóstico, así como la vinculación a la atención médica.

Caracterización de la epidemia de infección virémica por VHC en PQID que acuden a CRD en Cataluña:

1. Las muestras de DBS, a parte de facilitar el acceso al diagnóstico en PQID, han permitido estimar la prevalencia de la infección virémica por VHC (58.5%) por primera vez en PQID que acuden a CRD en Cataluña.

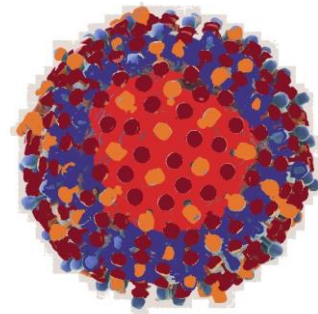
2. Las muestras de DBS permiten la caracterización de la diversidad inter- e intra-hospedador del VHC, lo que hace posible la identificación de las infecciones agudas y el análisis de *clusters* de transmisión.

3. La herramienta desarrollada "HCVGenotool" permite la identificación de los genotipos y subtipos del VHC de manera fiable, así como de las infecciones mixtas, a partir de los datos generados por NGS.

4. La identificación de las infecciones agudas a partir del marcador de diversidad genética intra-hospedador Entropía de Shannon permite estimar la incidencia en un estudio transversal.

5. La incidencia observada y el número de individuos en *clusters* de transmisión refleja una transmisión muy activa en la población de estudio, a pesar de la implementación de medidas preventivas en los CRD. Serán necesarias estrategias innovadoras de prevención y tratamiento para alcanzar la micro-eliminación del VHC, acorde con los objetivos propuestos por la OMS.

BIBLIOGRAFÍA



5. BIBLIOGRAFÍA

1. Saludes V, Folch C, Morales-Carmona A, Ferrer L, Fernández-López L, Muñoz R, et al. Community-based screening of hepatitis C with a one-step RNA detection algorithm from dried-blood spots: Analysis of key populations in Barcelona, Spain. *J Viral Hepat* 2018;25(3):236–44.
2. Ghafari M, Simmonds P, Pybus O, Katzourakis A. A Mechanistic Evolutionary Model Explains the Time-Dependent Pattern of Substitution Rates in Viruses. *SSRN Electron J*. Forthcoming 2021.
3. Ward JW. The Nobel Prize for discovery of HCV is a call to end hepatitis. *Lancet* 2020;396(10264):1733.
4. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* 1989;244(4902):359–62.
5. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland P V. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N Engl J Med* 1975;292(15):767–70.
6. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo Q-L, et al. Detection of Antibody to Hepatitis C Virus in Prospectively Followed Transfusion Recipients with Acute and Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321(22):1494–500.
7. Colombo M, Choo QL, Del Ninno E, Dioguardi N, Kuo G, Donato MF, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis c virus in italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989;334(8670):1006–8.
8. Kolykhalov AA, Agapov E V., Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of Hepatitis C by Intrahepatic Inoculation with Transcribed RNA. *Science* 1997;277(5325):570–4.
9. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length

- cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(16):8738–43.
10. Lohmann V, Körner F, Koch J-O, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* 1999;285(5424):110–3.
 11. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11(7):791–6.
 12. Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* 2007;367(1):126–34.
 13. Douam F, Lavillette D, Cosset F-L. The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2015;129:63-107.
 14. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88(6):2451–5.
 15. Gottwein JM, Bukh J. Chapter 2. Cutting the Gordian Knot-Development and Biological Relevance of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems. In: *Advances in Virus Research* 2008. p. 51–133.
 16. Lapa D, Garbuglia A, Capobianchi M, Del Porto P. Hepatitis C Virus Genetic Variability, Human Immune Response, and Genome Polymorphisms: Which Is the Interplay? *Cells* 2019;8(4):305.
 17. Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective Immunity Against Hepatitis C: Many Shades of Gray. *Front Immunol* 2014;5:274.
 18. Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 1999;80(10):2535–43.
 19. González-Candelas F, López-Labrador FX, Bracho MA. Recombination in

- Hepatitis C Virus. *Viruses* 2011;3(10):2006–24.
20. Shi W, Freitas IT, Zhu C, Zheng W, Hall WW, Higgins DG. Recombination in hepatitis c virus: Identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS One* 2012;7(7).
 21. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2014;20(43):15992.
 22. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO. A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002;76(8):4034–43.
 23. Hostager R, Ragonnet-Cronin M, Murrell B, Hedskog C, Osinusi A, Susser S, et al. Hepatitis C virus genotype 1 and 2 recombinant genomes and the phylogeographic history of the 2k/1b lineage. *Virus Evol* 2019 ;5(2):vez041.
 24. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42(4):962–73.
 25. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014;59(1):318–27.
 26. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis* 2018;218(11):1722–9.
 27. Eigen M, Gardiner W, Schuster P, Winkler-Oswatitsch R. The Origin of Genetic Information. *Sci Am* 1981;244(4):88–118.
 28. Eigen M, Schuster P. The Hypercycle. *Naturwissenschaften* 1978;65(1):7–41.
 29. Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological

- macromolecules. *Naturwissenschaften* 1971;58(10):465–523.
30. Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 1978;13(4):735–44.
 31. Domingo E, Martín V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as Quasispecies: Biological Implications. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2006;299:51-82.
 32. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66(5):3225–9.
 33. Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* 2007;127(2):131–50.
 34. Holmes EC. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol* 2003;11(12):543–6.
 35. Fishman SL, Branch AD. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 2009;9(6):1158–67.
 36. Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL, Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol* 1996;70(11):7622–31.
 37. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74(12):5463–7.
 38. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437(7057):376–80.
 39. Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics* 2013;14(1):444.
 40. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17(6):333–51.

41. Datta S. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World J Virol* 2015;4(3):265.
42. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. 2021. 71. Antonio Oliver Palomo (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. In: E C, R C, editors. 71. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2021.
43. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* 2012;13(5):303–14.
44. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules BT - Mammalian protein metabolism. 1969.
45. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16(2):111–20.
46. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985;22(2):160–74.
47. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Am Math Soc Lect Math Life Sci.* 1986;57–86.
48. Morrison DA. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual*, third edition.— Barry G. Hall. 2008. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. *Syst Biol* 2008;57(4):658–60.
49. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4(4):406–425.
50. Foxman B. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. *Am J Epidemiol* 2001;153(12):1135–41.
51. Aldous JL, Pond SK, Poon A, Jain S, Qin H, Kahn JS, et al. Characterizing HIV Transmission Networks Across the United States. *Clin Infect Dis* 2012;55(8):1135–43.

52. Farris JS. The Meaning of Relationship and Taxonomic Procedure. *Syst Zool* 1967;16(1):44.
53. Hillis DM, Bull JJ. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst Biol* 1993;42(2):182–92.
54. Jacka B, Applegate T, Kraiden M, Olmstead A, Harrigan PR, Marshall BDL, et al. Phylogenetic clustering of hepatitis C virus among people who inject drugs in Vancouver, Canada. *Hepatology* 2014;60(5):1571–80.
55. Olmstead AD, Joy JB, Montoya V, Luo I, Poon AFY, Jacka B, et al. A molecular phylogenetics-based approach for identifying recent hepatitis C virus transmission events. *Infect Genet Evol* 2015;33:101–9.
56. Hué S, Clewley JP, Cane PA, Pillay D. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS* 2004;18(5):719–28.
57. Lamoury FMJ, Jacka B, Bartlett S, Bull RA, Wong A, Amin J, et al. The Influence of Hepatitis C Virus Genetic Region on Phylogenetic Clustering Analysis. Vartanian J-P, editor. *PLoS One* 2015;10(7):e0131437.
58. Lamoury FMJ, Jacka B, Bartlett S, Bull RA, Wong A, Amin J, et al. The Influence of Hepatitis C Virus Genetic Region on Phylogenetic Clustering Analysis. Vartanian J-P, editor. *PLoS One* 2015;10(7):e0131437.
59. Escobar-Gutierrez A, Vazquez-Pichardo M, Cruz-Rivera M, Rivera-Osorio P, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Pacheco JA, et al. Identification of Hepatitis C Virus Transmission Using a Next-Generation Sequencing Approach. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1461–3.
60. Holmes EC, Grenfell BT. Discovering the phylodynamics of RNA viruses. *PLoS Computational Biology*. 2009;5(10):e1000505.
61. Grabowski MK, Redd AD. Molecular tools for studying HIV transmission in sexual networks. *Curr Opin HIV AIDS* 2014;9(2):126–33.

62. Bull RA, Luciani F, McElroy K, Gaudieri S, Pham ST, Chopra A, et al. Sequential Bottlenecks Drive Viral Evolution in Early Acute Hepatitis C Virus Infection. Ou JJ, editor. *PLoS Pathog* 2011;7(9):e1002243.
63. Wang GP, Sherrill-Mix SA, Chang K-M, Quince C, Bushman FD. Hepatitis C Virus Transmission Bottlenecks Analyzed by Deep Sequencing. *J Virol* 2010;84(12):6218–28.
64. Campo DS, Zhang J, Ramachandran S, Khudyakov Y. Transmissibility of intra-host hepatitis C virus variants. *BMC Genomics* 2017;18(S10):881.
65. Montoya V, Olmstead A, Tang P, Cook D, Janjua N, Grebely J, et al. Deep sequencing increases hepatitis C virus phylogenetic cluster detection compared to Sanger sequencing. *Infect Genet Evol* 2016;43:329–37.
66. World Health Organization. *Global Hepatitis Report 2017*. 2017.
67. Jadoul M, Bieber BA, Martin P, Akiba T, Nwankwo C, Arduino JM, et al. Prevalence, incidence, and risk factors for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2019;95(4):939–47.
68. Papadopoulos N, Argiana V, Deutsch M. Hepatitis C infection in patients with hereditary bleeding disorders: Epidemiology, natural history, and management. *Annals of Gastroenterology*. 2018;31(1):35-41
69. Westermann C, Peters C, Lisiak B, Lamberti M, Nienhaus A. The prevalence of hepatitis C among healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *Occup Environ Med* 2015;72(12):880–8.
70. European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis C*. In: ECDC. *Annual epidemiological report for 2018*. Stockholm; 2020.
71. Zibbell JE, Iqbal K, Patel RC, Suryaprasad A, Sanders KJ, Moore-Moravian L, et al. Increases in hepatitis C virus infection related to injection drug use among persons aged ≤ 30 years - Kentucky, Tennessee, Virginia, and West Virginia, 2006-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64(17):453–8.

72. K D, Lee W, Jan Y, Lee P-H. Hepatitis B Virus and Liver Transplantation. In: Liver Transplantation Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2010. p. 358.
73. Aaron S, McMahon JM, Milano D, Torres L, Clatts M, Tortu S, et al. Intranasal Transmission of Hepatitis C Virus: Virological and Clinical Evidence. *Clin Infect Dis* 2008;47(7):931–4.
74. van de Laar TJ, Matthews G V., Prins M, Danta M. Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection. *AIDS* 2010;24(12):1799–812.
75. Chan DPC, Sun H-Y, Wong HTH, Lee S-S, Hung C-C. Sexually acquired hepatitis C virus infection: a review. *Int J Infect Dis* 2016;49:47–58.
76. Hoornenborg E, Prins M, Achterbergh RCA, Woittiez LR, Cornelissen M, Jurriaans S, et al. Acquisition of wild-type HIV-1 infection in a patient on pre-exposure prophylaxis with high intracellular concentrations of tenofovir diphosphate: a case report. *Lancet HIV* 2017;4(11):e522–8.
77. Ramière C, Charre C, Miallhes P, Bailly F, Radenne S, Uhres A-C, et al. Patterns of Hepatitis C Virus Transmission in Human Immunodeficiency Virus (HIV)–infected and HIV-negative Men Who Have Sex With Men. *Clin Infect Dis* 2019;69(12):2127–35.
78. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2014;59(6):765–73.
79. Cottrell EB, Chou R, Wasson N, Rahman B, Guise J-M. Reducing Risk for Mother-to-Infant Transmission of Hepatitis C Virus: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2013;158(2):109.
80. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2(3):161–76.
81. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and

- sexually transmitted infections, 2021. Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. Geneva; 2021.
82. World Health Organization. Interim guidance for country validation of viral hepatitis elimination. Geneva; 2021.
 83. Limia Sánchez A, Olmedo Lucerón C. 2º Estudio de Seroprevalencia en España, 2017-2018. *Rev Esp Salud Publica*. 2021.
 84. Rodríguez-Tajes S, Domínguez Á, Carrión JA, Buti M, Quer JC, Morillas RM, et al. Significant decrease in the prevalence of hepatitis C infection after the introduction of direct acting antivirals. *J Gastroenterol Hepatol* 2020;35(9):1570–8.
 85. Davis C, Mgomella GS, da Silva Filipe A, Frost EH, Giroux G, Hughes J, et al. Highly Diverse Hepatitis C Strains Detected in Sub-Saharan Africa Have Unknown Susceptibility to Direct-Acting Antiviral Treatments. *Hepatology* 2019;69(4):1426–41.
 86. Aguilera A, Navarro D, Rodríguez-Frias F, Viciano I, Martínez-Sapiña AM, Rodríguez MJ, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *J Viral Hepat* 2017;24(9):725–32.
 87. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* 2015;44(4):717–34.
 88. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014;61(1):S58–68.
 89. Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2016;388(10049):1081–8.
 90. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–

- 40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018;392(10159):2052–90.
91. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Glob Hapat Program Dep HIV/AIDS 2016.
 92. World Health Organization. Action plan for the health sector response to viral hepatitis in the WHO European Region. Copenhagen 2017.
 93. World Health Organization. Compendium of good practices in the health sector response to viral hepatitis in the WHO European Region. Copenhagen 2020.
 94. Secretaría General de Sanidad y Consumo. Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC). Minist Sanidad, Consum y Bienestar Soc 2018.
 95. Lavin AC, Perello C, Llerena S, Gomez M, Escudero MD, Rodriguez L, et al. Prevalence of hepatitis C in the spanish population. The prevhep study (ethon cohort). *J Hepatol* 2017;66(1):S272.
 96. Hill A, Khan A, Bryony Simmons. “Diagnostic burn-out” for hepatitis C: When will countries run out of diagnosed people to treat with DAAS? *Hepatology*. 2017.
 97. CDA Foundation [página web]. Polaris Hep C Dashboard. 2017 [consultada el 22 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://cdafound.org/polaris-hepC-dashboard>
 98. Ministerio de Sanidad [página web]. El Ministerio de Sanidad reitera su compromiso de avanzar hacia la eliminación de la hepatitis C. 2019 [consultada el 10 de agosto de 2021]; Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/gabinete/notasPrensa.do?id=4672>
 99. Comissió per a l’elaboració del pla de prevenció i control de l’hepatitis c a catalunya. PLA DE PREVENCIÓ I CONTROL DE L’HEPATITIS C A CATALUNYA. Barcelona 2017.
 100. CatSalut. Servei Català de la Salut [página web]. Informe d’avaluació de resultats del tractament antiviral de l’hepatitis C crònica 2021 [consultada el 1 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://catsalut.gencat.cat/ca/detalls/noticies/2019->

- 02-07-informe-avaluacio-resultats-tractament-antiviral-hepatitis-c-cronica
101. Colom J. Comunicació personal en “Jornada l’hepatitis no pot esperar” 2021. Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=_BY2XhSomco.
 102. CatSalut. Servei Català de la Salut. Informe d’avaluació de resultats del tractament antiviral de l’hepatitis C crònica 2021.
 103. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak 2020.
 104. Blach S, Kondili LA, Aghemo A, Cai Z, Dugan E, Estes C, et al. Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts. *J Hepatol* 2021;74(1):31–6.
 105. Kondili LA, Marcellusi A, Ryder S, Craxì A. Will the COVID-19 pandemic affect HCV disease burden? *Dig Liver Dis* 2020;52(9):947–9.
 106. Picchio CA, Valencia J, Doran J, Swan T, Pastor M, Martró E, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on harm reduction services in Spain. *Harm Reduct J* 2020;17(1):87.
 107. Lens S, Miralpeix A, Gálvez M, Martró E, González N, Rodríguez-Tajes S, et al. Impact of the lockdown in an externalized HCV linkage-to-care model focusing on PWID patients with ongoing high risk practices. *Hepatology* 2020.
 108. Gamkrelidze I, Pawlotsky J, Lazarus J V., Feld JJ, Zeuzem S, Bao Y, et al. Progress towards hepatitis C virus elimination in high-income countries: An updated analysis. *Liver Int* 2021;41(3):456–63.
 109. Dunn PJH, Malinovsky D, Goenaga-Infante H. Calibration strategies for the determination of stable carbon absolute isotope ratios in a glycine candidate reference material by elemental analyser-isotope ratio mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(11):3169–80.
 110. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001;8(2):87–95.
 111. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory Diagnostics for

- Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis* 2012;55(suppl_1):S43–8.
112. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *Hepatology 2010 - A Clinical Textbook*. Sciences-New York. 2010.
 113. Bajis S, Applegate TL, Grebely J, Matthews G V., Dore GJ. Novel Hepatitis C Virus (HCV) Diagnosis and Treatment Delivery Systems: Facilitating HCV Elimination by Thinking Outside the Clinic. *J Infect Dis* 2020;222(Supplement_9):S758–72.
 114. Molero García JM, Linares Rufo M, Pérez Escanilla F. Guía de cribado de la infección por el virus de la hepatitis C en España, 2020. *Atención Primaria* 2021;53(3):101964.
 115. Crespo J, Lázaro P, Blasco AJ, Aguilera A, García-Samaniego J, Eiros JM, et al. Diagnóstico en un solo paso de la hepatitis C en 2019: una realidad en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2021;39(3):119–26.
 116. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky J-M. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2014;61(1):145–8.
 117. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: A new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36(1):211–8.
 118. Freiman JM, Tran TM, Schumacher SG, White LF, Ongarello S, Cohn J, et al. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection. *Ann Intern Med* 2016;165(5):345.
 119. Duchesne L, Lacombe K. Innovative technologies for point-of-care testing of viral hepatitis in low-resource and decentralized settings. *J Viral Hepat* 2018;25(2):108–17.
 120. Nguyen LT, Dunford L, Freitas I, Holder P, Nguyen LA, O’Gorman J, et al. Hepatitis C Virus Core Mutations Associated with False-Negative Serological Results for Genotype 3a Core Antigen. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2697–700.

121. Fourati S, Feld JJ, Chevaliez S, Luhmann N. Approaches for simplified HCV diagnostic algorithms. *J Int AIDS Soc* 2018;21:e25058.
122. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) [página web]. Press release. find explores new diagnostic technologies with the potential to confirm hepatitis c infection in community settings. 2021 [consultada el 20 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.finddx.org/newsroom/pr-16nov18/>
123. Martinello M, Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ, Matthews G V. Management of acute HCV infection in the era of direct-acting antiviral therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15(7):412–24.
124. Bruneau J, Zang G, Abrahamowicz M, Jutras-Aswad D, Daniel M, Roy E. Sustained Drug Use Changes After Hepatitis C Screening and Counseling Among Recently Infected Persons Who Inject Drugs: A Longitudinal Study. *Clin Infect Dis* 2014;58(6):755–61.
125. Pawlotsky J-M, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol* 2018;69(2):461–511.
126. Chung RT, Ghany MG, Kim AY, Marks KM, Naggie S, Vargas HE, et al. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDS A Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis* 2018;67(10):1477–92.
127. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. HEPATOLOGY A clinical textbook. 10th Edition. 2020.
128. Pawlotsky J-M, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol* 2020;73(5):1170–218.
129. Montoya V, Olmstead AD, Janjua NZ, Tang P, Grebely J, Cook D, et al. Differentiation of acute from chronic hepatitis C virus infection by nonstructural 5B deep sequencing: A population-level tool for incidence estimation. *Hepatology* 2015;61(6):1842–50.

130. Montoya V, Howe AYM, Dong WY, Dong W, Brumme CJ, Olmstead AD, et al. Intra-host evolutionary dynamics of the hepatitis C virus among people who inject drugs. *Sci Rep* 2021;11(1):9986.
131. Basyte-Bacevice V, Kupcinskas J. Evolution and Revolution of Hepatitis C Management: From Non-A, Non-B Hepatitis Toward Global Elimination. *Dig Dis* 2020;38(Suppl. 2):137–42.
132. Kamal SM. Advances in Treatment of Hepatitis C. In: *Advances in Treatment of Hepatitis C and B InTech*; 2017.
133. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011 Aug;55(2):245–64.
134. Pawlotsky JM, Aghemo A, Back D, Dusheiko G, Fornis X, Puoti M, et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 2015;63(1):199–236.
135. Carmena J, Castro MÁ, García F, García del Toro M, Granados R, Mena Á, et al. Documento de consenso del grupo español para el estudio de la hepatitis (GEHEP) sobre el tratamiento de la hepatitis C. 2015.
136. Saludes V. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3431.
137. Mokhtari C, Ebel A, Reinhardt B, Merlin S, Proust S, Roque-Afonso A-M. Characterization of Samples Identified as Hepatitis C Virus Genotype 1 without Subtype by Abbott RealTime HCV Genotype II Assay Using the New Abbott HCV Genotype Plus RUO Test. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* 2016;54(2):296–9.
138. Mallory MA, Lucic D, Ebbert MTW, Cloherty GA, Toolsie D, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott RealTime HCV genotype II plus RUO (PLUS) assay with reference to core and NS5B sequencing. *J Clin Virol* 2017;90:26–31.
139. Saludes V, Quer J, Gregori J, Bascuñana E, García-Cehic D, Esteban JI, et al. Identification of hepatitis C virus genotype 3 by a commercial assay challenged by natural polymorphisms detected in Spain from patients with diverse origins. *J*

- Clin Virol 2016;78:14–9.
140. He C, Germer JJ, Ptacek ER, Bommersbach CE, Mitchell PS, Yao JDC. Utility of the Abbott RealTime HCV Genotype Plus RUO assay used in combination with the Abbott RealTime HCV Genotype II assay. *J Clin Virol* 2018;99–100:97–100.
 141. Saludes V, Antuori A, Reinhardt B, Viciano I, Clavijo E, Schreiber L, et al. Reliable resolution of ambiguous hepatitis C virus genotype 1 results with the Abbott HCV Genotype Plus RUO assay. *Sci Rep* 2019;9(1):3678.
 142. Yusrina F, Chua CW, Lee CK, Chiu L, Png TS-Y, Khoo MJ, et al. Comparison of cobas HCV GT against Versant HCV Genotype 2.0 (LiPA) with confirmation by Sanger sequencing. *J Virol Methods* 2018;255:8–13.
 143. Cuypers L, Thijssen M, Shakibzadeh A, Sabahi F, Ravanshad M, Pourkarim MR. Next-generation sequencing for the clinical management of hepatitis C virus infections: does one test fits all purposes? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2019;56(6):420–34.
 144. Olmstead AD, Montoya V, Chui CK, Dong W, Joy JB, Tai V, et al. A systematic, deep sequencing-based methodology for identification of mixed-genotype hepatitis C virus infections. *Infect Genet Evol* 2019;69:76–84.
 145. Rodriguez C, Soulier A, Demontant V, Poiteau L, Mercier-Darty M, Bouvier-Alias M, et al. A novel standardized deep sequencing-based assay for hepatitis C virus genotype determination. *Sci Rep* 2018;8(1):4180.
 146. Applegate TL, Fajardo E, Sacks JA. Hepatitis C Virus Diagnosis and the Holy Grail. *Infect Dis Clin North Am.* 2018;32(2):425–45.
 147. Mane A, Sacks J, Sharma S, Singh H, Tejada-Strop A, Kamili S, et al. Evaluation of five rapid diagnostic tests for detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV): A step towards scale-up of HCV screening efforts in India. Carvalho LH, editor. *PLoS One* 2019;14(1):e0210556.
 148. Tang W, Chen W, Amini A, Boeras D, Falconer J, Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect Hepatitis C antibody: a meta-analysis and review of

- the literature. *BMC Infect Dis* 2017;17(S1):695.
149. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. New virological tools for screening, diagnosis and monitoring of hepatitis B and C in resource-limited settings. *J Hepatol* 2018;69(4):916–26.
 150. Chevaliez S. Strategies for the improvement of HCV testing and diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019;17(5):341–7.
 151. World Health Organization (WHO). WHO list of prequalified in vitro diagnostic products. 2021.
 152. Lamoury FMJ, Bajis S, Hajarizadeh B, Marshall AD, Martinello M, Ivanova E, et al. Evaluation of the Xpert HCV Viral Load Finger-Stick Point-of-Care Assay. *J Infect Dis* 2018;217(12):1889–96.
 153. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338–43.
 154. Biggar RJ, Miley W, Miotti P, Taha TE, Butcher A, Spadoro J, et al. Blood Collection on Filter Paper. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology* 1997;14(4):368–73.
 155. Parker SP, Cubitt WD, Ades AE. A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Virol Methods* 1997;68(2):199–205.
 156. Abe K, Konomi N. Hepatitis C Virus RNA in Dried Serum Spotted onto Filter Paper Is Stable at Room Temperature. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):3070–2.
 157. Lange B, Roberts T, Cohn J, Greenman J, Camp J, Ishizaki A, et al. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples – a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17(S1):693.
 158. Lange B, Cohn J, Roberts T, Camp J, Chauffour J, Gummadi N, et al. Diagnostic accuracy of serological diagnosis of hepatitis C and B using dried blood spot

- samples (DBS): two systematic reviews and meta-analyses. *BMC Infect Dis* 2017;17(S1):700.
159. European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis B and C epidemiology in selected population groups in the EU/EEA. Stockholm 2018.
160. European Centre for Disease Prevention and Control. Public health guidance on HIV, hepatitis B and C testing in the EU/EEA – An integrated approach. Stockholm 2018.
161. Mason LMK, Veldhuijzen IK, Duffell E, Ahee A, Bunge EM, Amato-Gauci AJ, et al. Hepatitis B and C testing strategies in healthcare and community settings in the EU/EEA: A systematic review. *J Viral Hepat* 2019;26(12):1431–53.
162. Buti M, Domínguez-Hernández R, Casado MÁ, Sabater E, Esteban R. Healthcare value of implementing hepatitis C screening in the adult general population in Spain. Liu C-H, editor. *PLoS One* 2018;13(11):e0208036.
163. European Centre for Disease Prevention and Control. European Centre for Disease Prevention and Control. Public health benefits of partner notification for sexually transmitted infections and HIV. Stockholm 2013.
164. Waked I, Esmat G, Elsharkawy A, El-Serafy M, Abdel-Razek W, Ghalab R, et al. Screening and Treatment Program to Eliminate Hepatitis C in Egypt. *N Engl J Med* 2020;382(12):1166–74.
165. Arora S, Thornton K. Novel Models of Hepatitis C Virus Care Delivery: Telemedicine, Project ECHO, and Integrative Care. *Clin Liver Dis* 2020;16(1):5–7.
166. National Health Service in England (NHS) Tayside [página web]. NHS Tayside first region in the world to eliminate hepatitis C. 2020 [consultada el 20 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.nhstayside.scot.nhs.uk/News/Article/index.htm?article=PROD_339892
167. Lazarus J V., Wiktor S, Colombo M, Thursz M. Micro-elimination – A path to global elimination of hepatitis C. *J Hepatol* 2017;67(4):665–6.

168. Lazarus J, Safreed-Harmon K, Thursz M, Dillon J, El-Sayed M, Elsharkawy A, et al. The Micro-Elimination Approach to Eliminating Hepatitis C: Strategic and Operational Considerations. *Semin Liver Dis* 2018;38(03):181–92.
169. Feld JJ, Ward JW. Key Elements on the Pathway to HCV Elimination: Lessons Learned From the AASLD HCV Special Interest Group 2020 . *Hepatol Commun*. 2021;5(6):911-922.
170. Cuadrado A, Llerena S, Cobo C, Pallás JR, Mateo M, Cabezas J, et al. Microenvironment Eradication of Hepatitis C: A Novel Treatment Paradigm. *Am J Gastroenterol* 2018;113(11):1639–48.
171. Day E, Hellard M, Treloar C, Bruneau J, Martin NK, Øvrehus A, et al. Hepatitis C elimination among people who inject drugs: Challenges and recommendations for action within a health systems framework. *Liver Int* 2019;39(1):20–30.
172. Agència de Salut Pública de Catalunya. Pla funcional del programa d'intercanvi de xeringues a les farmàcies comunitàries. Barcelona 2017.
173. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe Europeo sobre Drogas 2018: Tendencias y novedades. Luxemburgo 2018.
174. Puzhko S, Roy É, Jutras-Aswad D, Artenie AA, Fortier E, Zang G, et al. High hepatitis C incidence in relation to prescription opioid injection and poly-drug use: Assessing barriers to hepatitis C prevention. *Int J Drug Policy* 2017;47:61–8.
175. Sweeney S, Ward Z, Platt L, Guinness L, Hickman M, Hope V, et al. Evaluating the cost-effectiveness of existing needle and syringe programmes in preventing hepatitis C transmission in people who inject drugs. *Addiction* 2019;114(3):560–70.
176. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet* 2011;378(9791):571–83.
177. Degenhardt L, Peacock A, Colledge S, Leung J, Grebely J, Vickerman P, et al. Global prevalence of injecting drug use and sociodemographic characteristics

- and prevalence of HIV, HBV, and HCV in people who inject drugs: a multistage systematic review. *Lancet Glob Heal* 2017;5(12):e1192–207.
178. Grebely J, Larney S, Peacock A, Colledge S, Leung J, Hickman M, et al. Global, regional, and country-level estimates of hepatitis C infection among people who have recently injected drugs. *Addiction* 2019;114(1):150–66.
 179. Roncero C, Littlewood R, Vega P, Martinez-Raga J, Torrens M. Chronic hepatitis C and individuals with a history of injecting drugs in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2017;29(6):629–33.
 180. European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis C. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm 2020.
 181. Trickey A, Fraser H, Lim AG, Peacock A, Colledge S, Walker JG, et al. The contribution of injection drug use to hepatitis C virus transmission globally, regionally, and at country level: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4(6):435–44.
 182. Socías ME, Karamouzian M, Parent S, Barletta J, Bird K, Ti L. Integrated models of care for people who inject drugs and live with hepatitis C virus: A systematic review. *Int J Drug Policy* 2019;72:146–59.
 183. Lazarus J V., Pericàs JM, Picchio C, Cernosa J, Hoekstra M, Luhmann N, et al. We know DAAs work, so now what? Simplifying models of care to enhance the hepatitis C cascade. *J Intern Med* 2019;286(5):503–25.
 184. Day E, Broder T, Bruneau J, Cruse S, Dickie M, Fish S, et al. Priorities and recommended actions for how researchers, practitioners, policy makers, and the affected community can work together to improve access to hepatitis C care for people who use drugs. *Int J Drug Policy* 2019;66:87–93.
 185. Platt L, Minozzi S, Reed J, Vickerman P, Hagan H, French C, et al. Needle and syringe programmes and opioid substitution therapy for preventing HCV transmission among people who inject drugs: findings from a Cochrane Review and meta-analysis. *Addiction* 2018;113(3):545–63.

186. Stevens ER, Nucifora KA, Hagan H, Jordan AE, Uyei J, Khan B, et al. Cost-effectiveness of Direct Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection and a Combined Intervention of Syringe Access and Medication-assisted Therapy for Opioid Use Disorders in an Injection Drug Use Population. *Clin Infect Dis* 2020;70(12):2652–62.
187. Pericàs JM, Bromberg DJ, Ocampo D, Schatz E, Wawer I, Wysocki P, et al. Hepatitis C services at harm reduction centres in the European Union: a 28-country survey. *Harm Reduct J* 2019;16(1):20.
188. Agència de Salut Pública de Catalunya. Sistema d'Informació sobre Drogodependències de Catalunya. Informe anual 2019. Barcelona 2020.
189. Brugal MT, Teixidó-Compañó E, Guitart AM, Espelt A B-PM. Pla d'acció sobre drogues de Barcelona. 2017-2020. Barcelona 2017.
190. Platt L, Minozzi S, Reed J, Vickerman P, Hagan H, French C, et al. Needle and syringe programmes and opioid substitution therapy for preventing HCV transmission among people who inject drugs: findings from a Cochrane Review and meta-analysis. *Addiction* 2018;113(3):545-563.
191. Bajis S, Dore GJ, Hajarizadeh B, Cunningham EB, Maher L, Grebely J. Interventions to enhance testing, linkage to care and treatment uptake for hepatitis C virus infection among people who inject drugs: A systematic review. *Int J Drug Policy* 2017;47:34–46.
192. Grebely J, Dore GJ, Morin S, Rockstroh JK, Klein MB. Elimination of HCV as a public health concern among people who inject drugs by 2030 - What will it take to get there? *J Int AIDS Soc.* 2017;20(1):22146.
193. Goodyear T, Ti L, Carrieri P, Small W, Knight R. "Everybody living with a chronic disease is entitled to be cured": Challenges and opportunities in scaling up access to direct-acting antiviral hepatitis C virus treatment among people who inject drugs. *Int J Drug Policy* 2020;81:102766.
194. Versfeld A, McBride A, Scheibe A, Spearman CW. Motivations, facilitators and

- barriers to accessing hepatitis C treatment among people who inject drugs in two South African cities. *Harm Reduct J* 2020;17(1):39.
195. Grebely J, Applegate TL, Cunningham P, Feld JJ. Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(12):1109–15.
 196. Fernández-López L, Folch C, Majó X, Gasulla L, Casabona J. Implementation of rapid HIV and HCV testing within harm reduction programmes for people who inject drugs: a pilot study. *AIDS Care* 2016;28(6):712–6.
 197. Iversen J, Grebely J, Catlett B, Cunningham P, Dore GJ, Maher L. Estimating the cascade of hepatitis C testing, care and treatment among people who inject drugs in Australia. *Int J Drug Policy*. 2017;47:77–85.
 198. Kåberg M, Hammarberg A, Lidman C, Weiland O. Prevalence of hepatitis C and pre-testing awareness of hepatitis C status in 1500 consecutive PWID participants at the Stockholm needle exchange program. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;49(10):728–36.
 199. Folch C, Saludes V, Reyes-Ureña J, Antuori A, Ibáñez N, Majó X, et al. The hepatitis C care cascade among people who inject drugs accessing harm reduction services in Catalonia: Major gaps for migrants. *Int J Drug Policy* 2021;90:103057.
 200. Graf C, Mücke MM, Dultz G, Peiffer K-H, Kubesch A, Ingiliz P, et al. Efficacy of Direct-acting Antivirals for Chronic Hepatitis C Virus Infection in People Who Inject Drugs or Receive Opioid Substitution Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2020;70(11):2355–65.
 201. Marco A, Roget M, Cervantes M, Forné M, Planella R, Miquel M, et al. Comparison of effectiveness and discontinuation of interferon-free therapy for hepatitis C in prison inmates and noninmates. *J Viral Hepat*. 2018;25(11):1280-1286.
 202. Read P, Gilliver R, Kearley J, Lothian R, Cunningham EB, Chronister KJ, et al.

- Treatment adherence and support for people who inject drugs taking direct-acting antiviral therapy for hepatitis C infection. *J Viral Hepat* 2019;26(11):1301–10.
203. Coats JT, Dillon JF. The effect of introducing point-of-care or dried blood spot analysis on the uptake of hepatitis C virus testing in high-risk populations: A systematic review of the literature. *Int J Drug Policy* 2015;26(11):1050–5.
204. Martin NK, Hickman M, Miners A, Hutchinson SJ, Taylor A, Vickerman P. Cost-effectiveness of HCV case-finding for people who inject drugs via dried blood spot testing in specialist addiction services and prisons. *BMJ Open* 2013;3(8):e003153.
205. Holden J, Sharpe C, Stevens A, Smyth C, Cunningham P, McNulty A. DRIED BLOOD SPOT (DBS) TESTING PILOT [página web]. 2020 [consultada el 17 de Agosto de 2021]. Disponible en: <https://az659834.vo.msecnd.net/eventsairaeuprod/production-ashm-public/31c8e4edcb0d438caee41e18774371d1>
206. Hickman M, McDonald T, Judd A, Nichols T, Hope V, Skidmore S, et al. Increasing the uptake of hepatitis C virus testing among injecting drug users in specialist drug treatment and prison settings by using dried blood spots for diagnostic testing: a cluster randomized controlled trial. *J Viral Hepat* 2008;15(4):250–4.
207. Grebely J, Bruneau J, Lazarus J V., Dalgard O, Bruggmann P, Treloar C, et al. Research priorities to achieve universal access to hepatitis C prevention, management and direct-acting antiviral treatment among people who inject drugs. *Int J Drug Policy* 2017;47:51–60.
208. Peeling RW, Boeras DI, Marinucci F, Easterbrook P. The future of viral hepatitis testing: innovations in testing technologies and approaches. *BMC Infect Dis* 2017;17(S1):699.
209. Bajis S, Maher L, Treloar C, Hajarizadeh B, Lamoury FMJ, Mowat Y, et al. Acceptability and preferences of point-of-care finger-stick whole-blood and

- venepuncture hepatitis C virus testing among people who inject drugs in Australia. *Int J Drug Policy* 2018;61:23–30.
210. Fernández-López L, Folch C, Majó X, Gasulla L, Casabona J. Implementation of rapid HIV and HCV testing within harm reduction programmes for people who inject drugs: a pilot study. *AIDS Care*. 2016;28(6):712–6.
211. Crespo J, Lázaro de Mercado P, Blasco Bravo AJ, Aguilera Guirao A, García-Samaniego Rey J, Eiros Bouza JM, et al. El diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C en España: una oportunidad para mejorar. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;37(4):231–8.
212. Coats JT, Dillon JF. The effect of introducing point-of-care or dried blood spot analysis on the uptake of hepatitis C virus testing in high-risk populations: A systematic review of the literature. *Int J Drug Policy*. 2015;26(11):1050–5.
213. Martró E, González V, Buckton AJ, Saludes V, Fernández G, Matas L, et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):192-7.
214. World Health Organization. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Geneva; 2018.
215. Terrault NA, Pawlotsky J-M, McHutchison J, Anderson F, Kraiden M, Gordon S, et al. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005;12(5):465–72.
216. Bertisch B, Brezzi M, Negro F, Müllhaupt B, Ottiger C, Künzler-Heule P, et al. Very Low Hepatitis C Viral Loads in Treatment-naive Persons: Do They Compromise Hepatitis C Virus Antigen Testing? *Clin Infect Dis* 2019;70(4):653–9.
217. Freiman JM, Wang J, Easterbrook PJ, Horsburgh CR, Marinucci F, White LF, et al. Deriving the optimal limit of detection for an HCV point-of-care test for viraemic infection: Analysis of a global dataset. *J Hepatol* 2019;71(1):62–70.

218. Duvoux C, Pawlotsky J-M, Bastie A, Cherqui D, Soussy C-J, Dhumeaux D. Low HCV replication levels in end-stage hepatitis C virus-related liver disease. *J Hepatol* 1999;31(4):593–7.
219. Irvin R, Chander G, Falade-Nwulia O, Astemborski J, Starbird L, Kirk GD, et al. Overlapping epidemics of alcohol and illicit drug use among HCV-infected persons who inject drugs. *Addict Behav* 2019;96:56–61.
220. Lens S, Miralpeix A, Gálvez M, Martró E, Gonzalez N, Rodriguez-Tajes S, et al. High rate of early HCV reinfection among PWID with high-risk practices and re-treatment efficacy. *J Hepatol*. 2021;75(2):795.
221. Hajarizadeh B, Grady B, Page K, Kim AY, McGovern BH, Cox AL, et al. Patterns of Hepatitis C Virus RNA Levels during Acute Infection: The InC3 Study. Blackard J, editor. *PLoS One* 2015;10(4):e0122232.
222. Scott N, Sacks-Davis R, Pedrana A, Doyle J, Thompson A, Hellard M. Eliminating hepatitis C: The importance of frequent testing of people who inject drugs in high-prevalence settings. *J Viral Hepat* 2018;25(12):1472–80.
223. Folch C, Casabona J, Espelt A, Majó X, Meroño M, Gonzalez V, et al. High Prevalence and Incidence of HIV and HCV Among New Injecting Drug Users With a Large Proportion of Migrants—Is Prevention Failing? *Subst Use Misuse* 2016;51(2):250–60.
224. Valencia La Rosa J, Ryan P, Alvaro-Meca A, Troya J, Cuevas G, Gutiérrez J, et al. HCV seroconversion in a cohort of people who use drugs followed in a mobile harm reduction unit in Madrid: Breaking barriers for HCV elimination. Blackard J, editor. *PLoS One* 2018;13(10):e0204795.
225. Hope VD, Harris RJ, Vickerman P, Platt L, Shute J, Cullen KJ, et al. A comparison of two biological markers of recent hepatitis C virus (HCV) infection: implications for the monitoring of interventions and strategies to reduce HCV transmission among people who inject drugs. *Eurosurveillance* 2018;23(47):1700635.
226. Jordan AE, Des Jarlais DC, Arasteh K, McKnight C, Nash D, Perlman DC. Incidence

- and prevalence of hepatitis c virus infection among persons who inject drugs in New York City: 2006–2013. *Drug Alcohol Depend* 2015;152:194–200.
227. Mohamed Z, Mbwambo J, Rwegasha J, Mgina N, Doulla B, Mwakale P, et al. In-field evaluation of Xpert® HCV viral load Fingerstick assay in people who inject drugs in Tanzania. *Liver Int* 2020;40(3):514–21.
228. Grebely J, Lamoury FMJ, Hajarizadeh B, Mowat Y, Marshall AD, Bajis S, et al. Evaluation of the Xpert HCV Viral Load point-of-care assay from venepuncture-collected and finger-stick capillary whole-blood samples: a cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2(7):514–20.
229. Day CA, White B, Thein HH, Doab A, Dore GJ, Bates A, et al. Experience of hepatitis C testing among injecting drug users in Sydney, Australia. *AIDS Care* 2008;20(1):116–23.
230. Crespo J, Albillos A, Buti M, Calleja JL, García-Samaniego J, Hernández-Guerra M, et al. Eliminación de la hepatitis C. Documento de posicionamiento de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). *Gastroenterol Hepatol* 2019;42(9):579–92.
231. Lazarus J V., Picchio C, Dillon JF, Rockstroh JK, Weis N, Buti M. Too many people with viral hepatitis are diagnosed late — with dire consequences. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(8):451–2.
232. PCAVIVH - Programa de prevenció, control i atenció al virus d'immunodeficiència humana les infeccions de transmissió sexual (ITS) i les hepatitis víriques (HV). Protocol de diagnòstic i tractament del virus de l'hepatitis C per persones drogodependents. Barcelona 2020.
233. Folch C. Acceso a servicios sanitarios entre las personas que se inyectan drogas inmigrantes que acuden a los centros de reducción de daños de Cataluña. Toledo, Spain XLV Jornadas Nac Socidrogalcohol 2018.
234. Folch C, Esteve A, Zaragoza K, Munoz R, Casabona J. Correlates of intensive alcohol and drug use in men who have sex with men in Catalonia, Spain. *Eur J*

- Public Health 2010;20(2):139–45.
235. Smith BD, Jewett A, Burt RD, Zibbell JE, Yartel AK, DiNunno E. “To Share or Not to Share?” Serosorting by Hepatitis C Status in the Sharing of Drug Injection Equipment Among NHBS-IDU2 Participants. *J Infect Dis* 2013;208(12):1934–42.
236. CIBERESP Subprogram on Migration and Health. Migration and Health in Spain. 2016.
237. Miller CL, Johnston C, Spittal PM, Li K, LaLiberté N, Montaner JSG, et al. Opportunities for prevention: Hepatitis C prevalence and incidence in a Cohort of young injection drug users. *Hepatology* 2002;36(3):737–42.
238. Hacker MA, Friedman SR, Telles PR, Teixeira SL, Bongertz V, Morgado MG, et al. The Role of “Long-Term” and “New” Injectors in a Declining HIV/AIDS Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Subst Use Misuse* 2005;40(1):99–123.
239. Falade-Nwulia O, Gicquelais RE, Astemborski J, McCormick SD, Kirk G, Sulkowski M, et al. Hepatitis C treatment uptake among people who inject drugs in the oral direct-acting antiviral era. *Liver Int* 2020;40(10):2407–16.
240. Parés-Badell O, Espelt A, Folch C, Majó X, González V, Casabona J, et al. Undiagnosed HIV and Hepatitis C infection in people who inject drugs: From new evidence to better practice. *J Subst Abuse Treat* 2017;77:13–20.
241. Grebely J, Tran L, Degenhardt L, Dowell-Day A, Santo T, Larney S, et al. Association Between Opioid Agonist Therapy and Testing, Treatment Uptake, and Treatment Outcomes for Hepatitis C Infection Among People Who Inject Drugs: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2021;73(1):e107–18.
242. Berenguer J, Rivero A, Jarrín I, Núñez MJ, Vivancos MJ, Crespo M, et al. Human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfection in Spain: Prevalence and patient characteristics. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(2):ofw059
243. Young J, Rossi C, Gill J, Walmsley S, Cooper C, Cox J, et al. Risk Factors for Hepatitis C Virus Reinfection After Sustained Virologic Response in Patients

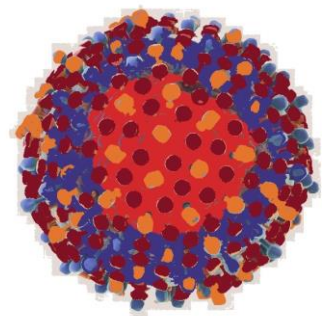
- Coinfected With HIV. *Clin Infect Dis* 2017;64(9):1154–62.
244. Tuailleon E, Mondain A-M, Meroueh F, Ottomani L, Picot M-C, Nagot N, et al. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology* 2010;51(3):752–8.
245. Tejada-Strop A, Drobeniuc J, Mixson-Hayden T, Forbi JC, Le N-T, Li L, et al. Disparate detection outcomes for anti-HCV IgG and HCV RNA in dried blood spots. *J Virol Methods* 2015;212:66–70.
246. Marques BLC, do Espírito-Santo MP, Marques VA, Miguel JC, da Silva EF, Villela-Nogueira CA, et al. Evaluation of dried blood spot samples for hepatitis C virus detection and quantification. *J Clin Virol* 2016;82:139–44.
247. Gregori J, Esteban JI, Cubero M, Garcia-Cehic D, Perales C, Casillas R, et al. Ultra-Deep Pyrosequencing (UDPS) Data Treatment to Study Amplicon HCV Minor Variants. Schildgen O, editor. *PLoS One* 2013;8(12):e83361.
248. Ramírez C, Gregori J, Buti M, Tabernero D, Camós S, Casillas R, et al. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res* 2013;98(2):273–83.
249. Bradshaw D, Bibby DF, Manso CF, Piorkowska R, Mohamed H, Ledesma J, et al. Clinical evaluation of a Hepatitis C Virus whole-genome sequencing pipeline for genotyping and resistance testing. *Clin Microbiol Infect* 2021;7(21):00373–6.
250. Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. High-Resolution Hepatitis C Virus Subtyping Using NS5B Deep Sequencing and Phylogeny, an Alternative to Current Methods. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* 2015;53(1):219–26.
251. Patel EU, Cox AL, Mehta SH, Boon D, Mullis CE, Astemborski J, et al. Use of Hepatitis C Virus (HCV) Immunoglobulin G Antibody Avidity as a Biomarker to Estimate the Population-Level Incidence of HCV Infection. *J Infect Dis* 2016;214(3):344–52.

252. Robaeys G, Bielen R, Azar DG, Razavi H, Nevens F. Global genotype distribution of hepatitis C viral infection among people who inject drugs. *J Hepatol* 2016;65(6):1094–103.
253. McMahon BJ, Bruden D, Townshend-Bulson L, Simons B, Spradling P, Livingston S, et al. Infection With Hepatitis C Virus Genotype 3 Is an Independent Risk Factor for End-Stage Liver Disease, Hepatocellular Carcinoma, and Liver-Related Death. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15(3):431-437.e2.
254. Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, Fried MW, Segal JB, Sulkowski MS. Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection. *Ann Intern Med* 2017;166(9):637.
255. Hajarizadeh B, Cunningham EB, Reid H, Law M, Dore GJ, Grebely J. Direct-acting antiviral treatment for hepatitis C among people who use or inject drugs: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018;3(11):754–67.
256. Cunningham EB, Amin J, Feld JJ, Bruneau J, Dalgard O, Powis J, et al. Adherence to sofosbuvir and velpatasvir among people with chronic HCV infection and recent injection drug use: The SIMPLIFY study. *Int J Drug Policy* 2018;62:14–23.
257. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Case definitions for acute hepatitis C virus infection: A systematic review. *J Hepatol* 2012;57(6):1349–60.
258. Thomson EC, Nastouli E, Main J, Karayiannis P, Eliahoo J, Muir D, et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS* 2009;23(1):89–93.
259. Patel EU, Cox AL, Mehta SH, Boon D, Mullis CE, Astemborski J, et al. Use of Hepatitis C Virus (HCV) Immunoglobulin G Antibody Avidity as a Biomarker to Estimate the Population-Level Incidence of HCV Infection. *J Infect Dis* 2016;214(3):344–52.
260. Boon D, Bruce V, Patel EU, Quinn J, Srikrishnan AK, Shanmugam S, et al. Antibody avidity-based approach to estimate population-level incidence of

- hepatitis C. *J Hepatol* 2020;73(2):294–302.
261. Hope VD, Hickman M, Ngui SL, Jones S, Telfer M, Bizzarri M, et al. Measuring the incidence, prevalence and genetic relatedness of hepatitis C infections among a community recruited sample of injecting drug users, using dried blood spots. *J Viral Hepat* 2011;18(4):262–70.
 262. Vallejo F, Barrio G, Brugal MT, Pulido J, Toro C, Sordo L, et al. High hepatitis C virus prevalence and incidence in a community cohort of young heroin injectors in a context of extensive harm reduction programmes. *J Epidemiol Community Health* 2015;69(6):599–603.
 263. Morris MD, Shiboski S, Bruneau J, Hahn JA, Hellard M, Prins M, et al. Geographic Differences in Temporal Incidence Trends of Hepatitis C Virus Infection Among People Who Inject Drugs: The InC3 Collaboration. *Clin Infect Dis* 2017;64(7):860–9.
 264. Zelenev A, Li J, Mazhnaya A, Basu S, Altice FL. Hepatitis C virus treatment as prevention in an extended network of people who inject drugs in the USA: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2018;18(2):215–24.
 265. Zelenev A, Li J, Shea P, Hecht R, Altice FL. Modeling Combination Hepatitis C Virus Treatment and Prevention Strategies in a Network of People Who Inject Drugs in the United States. *Clin Infect Dis* 2021;72(5):755–63.
 266. Pilon R, Leonard L, Kim J, Vallee D, De Rubeis E, Jolly AM, et al. Transmission Patterns of HIV and Hepatitis C Virus among Networks of People Who Inject Drugs. Ravichandran V, editor. *PLoS One* 2011;6(7):e22245.
 267. Jacka B, Applegate T, Poon AF, Raghwani J, Harrigan PR, DeBeck K, et al. Transmission of hepatitis C virus infection among younger and older people who inject drugs in Vancouver, Canada. *J Hepatol* 2016;64(6):1247–55.
 268. Sacks-Davis R, Daraganova G, Aitken C, Higgs P, Tracy L, Bowden S, et al. Hepatitis C Virus Phylogenetic Clustering Is Associated with the Social-Injecting Network in a Cohort of People Who Inject Drugs. Blackard J, editor. *PLoS One*

- 2012;7(10):e47335.
269. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005;5(2):131–9.
270. Bartlett SR, Jacka B, Bull RA, Luciani F, Matthews G V., Lamoury FMJ, et al. HIV infection and hepatitis C virus genotype 1a are associated with phylogenetic clustering among people with recently acquired hepatitis C virus infection. *Infect Genet Evol* 2016;37:252–8.
271. Mittal ML, Jain S, Sun S, DeBeck K, Milloy MJ, Hayashi K, et al. Opioid agonist treatment and the process of injection drug use initiation. *Drug Alcohol Depend* 2019;197:354–60
272. Baluku M, Wamala T. When and how do individuals transition from regular drug use to injection drug use in Uganda? Findings from a rapid assessment. *Harm Reduct J* 2019;16(1):73.
273. Hunt, Paul Griffiths, Mathew Southw N. Preventing and curtailing injecting drug use: a review of opportunities for developing and delivering “route transition interventions.” *Drug Alcohol Rev* 1999;18(4):441–51.
274. Hahn JA, Tully DC, Evans JL, Morris MD, Briceno A, Bean DJ, et al. Role of HCV Viremia in Corroborated HCV Transmission Events Within Young Adult Injecting Partnerships. *Open Forum Infect Dis* 2019;6(4):ofz125.
275. Hellard M, Rolls DA, Sacks-Davis R, Robins G, Pattison P, Higgs P, et al. The impact of injecting networks on hepatitis C transmission and treatment in people who inject drugs. *Hepatology* 2014;60(6):1861–70.

ARTÍCULOS



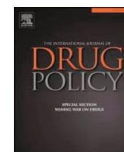
6. ARTÍCULOS

Artículo I



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Drug Policy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/drugpo

Research Paper

Evaluation of the Xpert HCV VL Fingerstick point-of-care assay and dried blood spot HCV-RNA testing as simplified diagnostic strategies among people who inject drugs in Catalonia, Spain



V. Saludes^{a,b,c,d}, A. Antuori^{a,b,c}, J.V. Lazarus^e, C. Folch^{d,f}, S. González-Gómez^{a,b,c}, N. González^g, N. Ibáñez^h, J. Colomⁱ, L. Matas^{a,b,c,d}, J. Casabona^{d,f}, E. Martró^{a,b,c,d,s}

^a Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^b Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

^c Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^e Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^f Centre for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia (CEEISCAT), Public Health Agency of Catalonia (ASPCAT), Badalona, Spain

^g Drug consumption room "El Local", IPSS Foundation, Sant Adrià del Besòs, Barcelona, Spain

^h Program on Substance Abuse, ASPCAT, Barcelona, Spain

ⁱ Program for the Prevention, Control and Treatment of HIV, Sexually Transmitted Infections and Viral Hepatitis, ASPCAT, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepatitis C virus (HCV)
Diagnostics
HCV-RNA point-of-care test (PoCT)
Dried blood spots (DBS)
People who inject drugs (PWID)

ABSTRACT

Background: Catalonia requires decentralized and simplified strategies for the diagnosis of viremic HCV infection among people who inject drugs (PWID). We aimed to perform a direct comparison of the diagnostic performance between two, single-step strategies for the screening and diagnosis of viremic HCV infection in PWID attending a drug consumption room (DCR) in Barcelona: i) on-site HCV-RNA testing using the point-of-care test (PoCT) Xpert HCV VL Fingerstick; and ii) on-site dried blood spots (DBS) collection for HCV-RNA testing at the laboratory (in-house assay). Additionally, we aimed to assess participants' preferences in receiving HCV-RNA testing results and feasibility of same-day delivery of PoCT results.

Methods: The real-world, clinical performance of these two strategies was established in comparison with the reference method (HCV viral load testing with the Xpert HCV Viral Load assay at the laboratory from venous plasma collected at the DCR). HCV genotypes/subtypes and HIV status were also determined by sequencing and serology, respectively. A questionnaire including preferences regarding the delivery of test results was administered.

Results: The prevalence of HCV-RNA was 63.0% (of which 25.8% were co-infected with HIV). The RNA-PoCT showed a sensitivity of 98.4% for detectable viral loads (> 4 IU/mL) and of 100% for quantifiable viral loads (≥ 10 , ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL). For the DBS-based assay, a sensitivity of 93.7% was obtained for detectable viral loads, 96.7% for the quantifiable ≥ 10 IU/mL threshold, and 98.3% for both the quantifiable ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL thresholds. No significant differences were detected between the sensitivity values of these two strategies, and the specificity was 100% in both cases. Half of the participants preferred to receive the HCV-RNA result on the same day, and 80% of participants received their RNA-PoCT results on the same day.

Conclusions: Both the HCV-RNA PoCT and the DBS-based assay are highly reliable tools for the simplified diagnosis of viremic HCV infection among current PWID. These strategies allow for on-site sample collection and delivery of test results, facilitating decentralized care in harm reduction services.

* Corresponding author at: Microbiology Department, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute (IGTP), Crta. del Canyet s/n 08916 Badalona, Spain.

E-mail address: emartro@igtp.cat (E. Martró).

<https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.102734>

0955-3959/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The World Health Organization (WHO) has set reaching 90% diagnosis and 80% treatment rates as the main targets in the effort to eliminate hepatitis C virus (HCV) infection as a major public health threat by 2030 (World Health Organization, 2016). In Spain, driven by the Strategic Plan for Tackling Hepatitis C in the National Health System, treatment rates have improved remarkably (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2018). Nevertheless, people who inject drugs (PWID), who constitute the core of the HCV epidemic in Europe (Grebely et al., 2019) as well as in Catalonia (Folch et al., 2016), still face numerous barriers in accessing mainstream healthcare services for hepatitis C confirmatory diagnosis and treatment (Fernández-López, Folch, Majó, Gasulla & Casabona, 2016).

In Catalonia, there is a comprehensive network of drug harm-reduction services (HRS), including 16 centers and six mobile units (12 of them with supervised drug consumption rooms (DCR)), that conjointly cared for over 6000 PWID in 2018 (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2019). Since 2011, these HRS have been offering on-site HCV testing with an antibody point-of-care test (Ab-PoCT), and those with a positive result are referred to the mainstream healthcare services for viral load confirmation in venous plasma and disease evaluation. Remarkably, an estimated 31% of PWID fail to attend confirmatory RNA testing (Fernández-López et al., 2016). Consequently, simplified testing strategies for the identification of viremic individuals are urgently needed in the context of HRS, which may facilitate not only decentralized diagnosis but also treatment, as a micro-elimination strategy (Lazarus et al., 2018) among PWID in Catalonia.

Governments must invest in HCV prevention, testing, and treatment to provide more comprehensive services to PWID in order to achieve the HCV elimination targets. HCV testing should be simple, high quality, affordable, and accessible within existing services caring for this collective (Cooke et al., 2019; Douglass et al., 2018; Schröder et al., 2019). Diagnosis of viremic HCV infection among PWID who attend HRS can be simplified by on-site collection of dried blood spot (DBS) samples for RNA testing in the laboratory or by using an HCV-RNA PoCT (Applegate, Fajardo & Sacks, 2018; Chevaliez, 2019).

The recently CE-marked HCV-RNA PoCT (Xpert® HCV VL Fingerstick, Cepheid; hereafter, Xpert FS) was developed to improve the diagnosis of viremic infection at the point of care, enabling the delivery of HCV-RNA results at the time of testing without the need for a follow-up visit (Cepheid, 2019a). In comparison with the previously existing Xpert HCV Viral Load assay (hereafter, Xpert VL) (Cepheid, 2019b) and the Genedrive system (Genedrive Diagnostics, Manchester, UK) which were designed to be used as HCV-RNA PoCT using either plasma or serum (Grebely, Lamoury, et al., 2017; Llibre et al., 2018), the Xpert FS assay has a faster turnaround time and uses 100 µl volume of whole blood collected by fingerstick. Consequently, common losses to follow-up among PWID who do not return to obtain their results may be reduced, and the need for venipuncture is avoided. Fingerstick testing is preferred by PWID over venipuncture mainly because fingerstick is quicker but also because PWID tend to have poor venous access and a fear of having a vein damaged (Bajis et al., 2018; Harris, McDonald, & Rhodes, 2014). Additionally, plasma separation and cold chain maintenance of clinical samples are not needed, further simplifying the testing logistics outside of hospitals and clinics.

The use of DBS has been shown to enhance HCV testing and linkage to care among PWID (Grebely et al., 2017). In the context of the HepCdetect II study, HCV-RNA testing from DBS was implemented and evaluated as a one-step screening and diagnosis strategy in four HRS in Catalonia (European Monitoring Centre for Drugs & Drug Addiction, 2019; Saludes et al., 2019a). Among them, the DCR participating in the present study is located near one of the most active drug-trafficking and consumption areas in Spain: La Mina neighborhood in Sant Adrià de Besòs, Barcelona. This center cares for the largest number of different drug users per year within the entire Catalan HRS network

(2093 users in 2017 (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2018)) and many of their users come sporadically from diverse geographical areas in Catalonia. These factors might have limited the number of users who returned and received their HCV-RNA results (results were delivered to 76% of viremic individuals) (Saludes et al., 2019a). Therefore, the use of an HCV-RNA PoCT in this setting may reduce the number of loss to follow-up (Grebely et al., 2017). The Xpert FS assay generates results in about one hour and has shown an excellent clinical performance as an HCV-RNA PoCT (Lamoury et al., 2018). However, as several factors may influence the clinical performance of diagnostic assays, such as HCV prevalence, viral loads in viremic individuals, circulating genotypes/subtypes, HIV co-infection, and the ability of the staff performing the assay, field validations performed in different settings could provide useful information for implementation purposes. Additionally, the feasibility of same-day delivery of test results should be evaluated.

The main aim of this study was to perform a direct comparison of the diagnostic performance between two single-step strategies for the screening and diagnosis of viremic HCV infection in PWID attending a DCR: 1) HCV-RNA testing at the DCR using the RNA-PoCT Xpert FS assay; and 2) DBS collection at the DCR followed by HCV-RNA testing at a central laboratory with an in-house HCV-RNA testing assay previously validated in this setting (Saludes et al., 2019a). Additionally, we aimed to assess participants' preferences on receiving HCV-RNA testing results and feasibility of same-day delivery of PoCT results.

Material and Methods

Study design and participants

This was a community-based, cross-sectional study in a convenience sample of PWID ≥ 18 years old who had injected drugs over the previous six months and were not receiving HCV treatment. Participants were recruited at a DCR in Barcelona, Spain, by their own staff one day per week (generally on Friday to accommodate the schedule of the other DCR activities). Assuming a prevalence of viremic HCV infection of 60% and a sensitivity and specificity of 100% for the Xpert FS PoCT in comparison with the reference method (HCV viral load testing with the Xpert HCV Viral Load assay at the laboratory from venous plasma collected at the DCR), 100 participants were estimated to provide a 95% confidence interval (CI) of 50.2–69.1% for the prevalence estimate and a 95% CI of 94.0–100% for the estimates of sensitivity and 91.2–100% for specificity. In order to encourage participation and study completion, an economic incentive of €6 was offered upon delivery of the confirmed test results obtained by the reference method (generally available on the next working day, i.e. Monday). Participants were recruited from May 2018 to February 2019 and provided written, informed consent. Each participant was assigned an anonymous identifying number used to link the questionnaire with tests results. The study was approved by the Ethics Committee at the Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona (Barcelona), Spain, in 2017.

Epidemiological data collection

An anonymous 27-item questionnaire administered by DCR staff at enrolment was used for data collection. It included questions regarding to socio-demographic characteristics, data regarding previous sexual behavior, injected/non-injected drug use, types of drugs consumed, imprisonment, self-reported HCV and HIV testing, previous diagnosis and treatment of HCV and HIV infections, previous diagnosis of other unspecified sexually transmitted infections, and preferences on receiving HCV-RNA results. Participants were asked to choose from the following options of receiving HCV-RNA results: receiving results on the same day, even if they had to wait for an hour, receiving results another day when returning to the center, or no expressed preference.

Training of the DCR staff

Nursing DCR staff had previously been trained for DBS collection and storage in the context of the HepCdetect II study (Saludes et al., 2019a). Regarding the procedure of the Xpert FS assay, they were newly trained by Cepheid personnel.

Clinical specimens

At recruitment in the DCR, each participant underwent fingerstick capillary blood collection for: i) HCV Ab-PoCT testing; ii) HCV RNA-PoCT testing; and iii) DBS collection for HCV-RNA detection and genotyping. Four 12 mm spots of approximately 50 μ l of fingerstick capillary blood each were collected for each study participant, then dried and stored at room temperature as previously described (Saludes et al., 2019a). DBS samples were shipped to the central laboratory at room temperature the following day (Microbiology Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona). Additionally, a paired ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) venous blood sample was collected by venipuncture at the DCR, stored overnight at 4 °C, and shipped refrigerated to the central laboratory the following day, where plasma was separated by centrifugation and subjected to the reference HCV viral load method (Xpert VL). The rest of the plasma was stored at -80 °C and, in case of discordant results between the Xpert FS assay and the reference method, viral load testing was performed with a different HCV viral load assay (Abbott HCV RealTime assay, Abbott Molecular Inc.; see below). Finally, the plasma samples were also used for HIV antigen/antibody testing, and for HCV antibody testing by conventional serology when an HCV Ab-PoCT false negative result was suspected.

HCV and HIV tests

HCV Ab-PoCT. The Hepatitis C Virus Antibody Cassette test (Türkklab Tibbi Malzemeler San. ve Tic. A.Ş., Çiğli/Izmir, Turkey), a CE-marked qualitative immunoassay with a sensitivity and specificity of 100%, according to the manufacturer, was used for fingerstick blood. Results were visually read in 15 min and recorded in the questionnaire.

HCV serology testing. When an HCV Ab-PoCT false negative result was suspected, the paired plasma samples were tested for antibodies against HCV with the VITROS® Anti-HCV assay (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA).

HCV RNA-PoCT. 100 μ l of capillary whole-blood was collected by fingerstick according to the manufacturer's instructions and immediately tested with the Xpert FS assay on a four-module GeneXpert® System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) operated by DCR staff (assay completion time, 58 min; limit of detection -LoD-, 35 IU/mL; limit of quantification -LoQ-, 100 IU/mL). The first 67 participants were tested with a research-use-only version of the Xpert FS assay, and the last 33 cases with the CE-marked version of the assay. The research-use-only and the CE-IVD marked versions of the Xpert HCV VL Fingerstick cartridge were the same. The personnel at the DCR received direct support from the central laboratory in order to resolve incidents and remotely validate the results in real time (verification of the amplification curves of the test controls and the HCV target) using TeamViewer software (Germany, GmbH).

Reference HCV viral load method. In the laboratory, paired plasma samples were tested with the CE-IVD marked Xpert VL assay on a four-module GeneXpert® System according to manufacturer's recommendations (assay completion time, 105 min; LoD, 4 IU/mL; LoQ, 10 IU/mL). Specimens with discordant results between the Xpert FS assay or the DBS-based assay and the reference method, were further tested with the Abbott HCV RealTime assay (Abbott Molecular Inc.; LoD and LoQ, 12 IU/mL), according to the manufacturer's instructions. Laboratory technicians were blinded to the RNA-PoCT results obtained at the DCR.

HCV-RNA detection in DBS. Two 12 mm spots were subjected to elution, nucleic acid extraction, and qualitative detection of the HCV-

RNA and an internal control by an in-house reverse-transcription and duplex real-time PCR reaction in a single step (Saludes et al., 2018a).

HCV genotyping. RNA previously extracted from DBS samples was subjected to reverse-transcription as previously described (Saludes et al., 2019a). Then, NS5B amplification was performed by heminested-PCR as follows. The first PCR round was carried out with 2.5 μ l of the HCV cDNA in a final reaction volume of 25 μ l containing 1 \times PCR buffer (Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), 10 pmol of primers P1203 and P1204 (Mellor, Holmes, Jarvis, Yap & Simmonds, 1995), 0.2 mM dNTPs, and 1 U of GoTaq® Flexi G2 DNA polymerase (Promega). Thermocycler conditions of the first PCR were 94 °C for 30 s; 35 cycles at 94 °C for 30 s, 54 °C for 40 s, and 72 °C for 50 s; and a final elongation step at 72 °C for 30 s. The second PCR round was performed with 2 μ l of the first PCR product in a final reaction volume of 50 μ l containing 1 \times PCR buffer (Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), 10 pmol of primers NS5B n2' (Martró et al., 2008) and P1204, 0.2 mM dNTPs, and 1 U of GoTaq® Flexi G2 DNA polymerase (Promega). Thermocycler conditions of the second PCR were 94 °C for 5 min; 30 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 40 s, and 72 °C for 50 s; and a final elongation step at 72 °C for 30 s. Sanger sequencing and phylogenetic analysis along with reference sequences was performed as previously described (Saludes et al., 2019b). When this methodology failed to provide a valid sequence due to low viral loads, the Abbott HCV Genotype II assay (Abbott Molecular Inc.) was used from plasma samples following the manufacturer's recommendations.

HIV serology testing. Antigen and antibodies against HIV-1/2 were tested for with the VITROS® HIV Combo assay (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA).

Results delivery and referral to care

DCR professionals delivered HCV viral load and HIV serology results to participants, performed post-test counseling, and referred participants to care when needed. As this study started before the Xpert FS assay obtained CE-IVD marking, a provisional report with Xpert FS assay results was generated after remote validation from the laboratory as advised by Cepheid and delivered to participants on the same day of testing when possible. Confirmed results were available on the next working day (on Mondays) and delivered to participants at a second visit to the DCR together with HIV serology results and the economic incentive. During this second visit, referral to care was initiated for all those who were viremic and were not already linked to care. Delivery of Xpert FS assay and reference method results as well as referral to care were recorded. No follow-up was performed to assess linkage to care after referral.

Statistical analyses

HCV seroprevalence was determined from Ab-PoCT results, and the prevalence of viremic infection was derived from the HCV-RNA results obtained with the reference method. The sensitivity and specificity of the Xpert FS assay and the DBS-based assay were assessed in comparison with the results from the reference method in plasma considering all positive results above the LoD of the reference method, either quantifiable or not (detectable threshold). Sensitivity was also assessed using three additional viral load thresholds: quantifiable \geq 10 IU/mL (viral load equal or above the LoQ of the reference method), quantifiable \geq 1000 IU/mL (according to the recommendations of the European Association for the Study of the Liver (EASL) for HCV-RNA assays offering broad affordable access to HCV diagnosis and care (European Association for the Study of the Liver, 2018)) and quantifiable \geq 3000 IU/mL (according to WHO guidelines for assays offering improved diagnostic accessibility (World Health Organization, 2018)). The 95% CI were calculated using the Wilson Score method with OpenEpi software version 3.01 (Dean, Sullivan & Soe, 2013). For detectable HCV-RNA results, agreement with the reference method was assessed by the Kappa index. For samples with quantifiable results by both the Xpert FS

Table 1
Characteristics of the study population.

Characteristics	n/N (%)
Socio-demographic characteristics	
Median age (range), years	43.9 (25–61)
Male gender	86/100 (86.0)
Foreign origin	22/100 (22.0)
Educational attainment > primary	32/99 (32.3)
Homeless*	28/100 (28.0)
Paid employment*	24/95 (25.3)
Ever been in prison	69/100 (69.0)
Bio-behavioral characteristics	
New injectors (<5 years)	21/99 (21.2)
Injection while in prison	24/100 (24.0)
Daily injection*	71/100 (71.0)
Cocaine as the most frequently injected drug*	39/99 (39.4)
Sharing of syringes	49/100 (49.0)
Sharing of other injection equipment	55/100 (55.0)
Practicing front-backloading	33/98 (33.7)
Drug snorting	61/100 (61.0)
Sharing cocaine snorting straw	42/59 (71.2)
Drug smoking	43/99 (43.4)
Currently in drug dependence treatment	53/100 (53.0)
Unprotected sex with penetration with sex worker, PWID, HIV-positive or MSM individuals**	25/94 (26.6)
Exchange of sex for drugs or money**	3/100 (3.0)
Past or current HCV infection	91/100 (91.0)
HIV infection	27/100 (27.0)
Under antiretroviral therapy	19/27 (70.4)
Self-reported sexually transmitted infections**	6/98 (6.1)

Percentages are expressed excluding missing values.

Questions were referred to ever in life except for:

* Previous 6 months;

** Previous 12 months.

assay and the reference method, correlation was assessed through regression analysis and bias by Bland-Altman plots. The sensitivity was compared between the Xpert FS assay and the DBS-based assay at each of the viral load thresholds by the Pearson's Chi-square test with Yates correction or the Fisher's exact test, as required. Participants' preferences on receiving HCV-RNA results were compared between individuals who were aware or unaware of their HCV status by the Pearson's Chi-square or Likelihood ratio tests, as required. The analyses were performed using SPSS version 17 and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Study population characteristics

Participants ($N = 100$) were mostly male (86.0%) with a median age of 43.9; 28.0% were homeless, 22.0% were migrants, 69.0% had ever been in prison, and 71.0% injected drugs daily (see Table 1). Overall, 99 participants had been previously tested for HCV (1 – 10 times); 76 participants reported having a previous HCV diagnosis; and 28 (36.8%) of them reported receiving antiviral treatment. Among the latter, 24 participants (85.7%) had completed treatment, 14 (50.0%) received interferon-based treatment, and 23 (82.1%) reported having achieved cure (six of them were currently viremic).

The prevalence was 89.0% (95% CI, 81.4 – 93.7%) for anti-HCV antibodies and 63.0% (95% CI, 53.2 – 71.8%) for viremic HCV infection. Two participants were RNA positive and Ab-PoCT negative (3.2% of the total number of viremic participants); thus, the prevalence of past or current HCV infection was 91.0%. When these two participants were tested for anti-HCV antibodies in venous plasma, one was identified as a false negative result of the Ab-PoCT and the other one as an acute infection within the antibody window period. HCV/HIV co-infection was observed in 16 (25.4%) of the participants with viremic HCV infection.

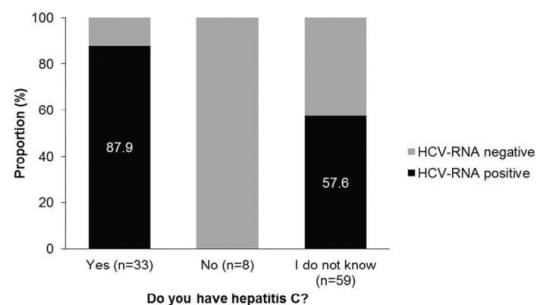


Fig. 1. Prevalence of viremic infection (HCV-RNA positive by the Xpert VL assay) according to self-reported status.

When participants were asked whether they currently had hepatitis C, 33 answered yes (none of them were undergoing antiviral treatment), 8 answered no, and 59 answered that they did not know. The proportions of viremic infection according to self-reported status are shown in Fig. 1. Overall, 39.0% of the participants were unaware of their HCV status; 34 (54.8%) of the viremic participants were unaware of having hepatitis C and five (13.5%) of the non-viremic patients believed they had hepatitis C, but they had cleared the infection. Regarding HIV infection, two (7.4%) of the HIV-positive participants were unaware of their status and, overall, 70.4% reported they were receiving antiretroviral therapy.

Real-world clinical performance of the RNA-PoCT and DBS assays

RNA-PoCT

The concordance of the Xpert FS assay with the reference method was very good (Kappa = 0.979). Specificity was 100% (95% CI, 90.1% – 100%), as no false-positive result was obtained in comparison with the Xpert VL assay as the reference method, and sensitivity was 98.4% (95% CI, 91.5–99.7) (Table 2). There was one discordant result (1/63 false-negative result), which corresponded to a participant with a positive but unquantifiable viral load (<10 IU/mL) in plasma by the reference method and an undetectable result by the Xpert FS assay. The viral load of this participant was confirmed as positive in plasma by the Abbott assay (positive <12 IU/mL), and this participant had a positive Ab-PoCT result. There was another participant with a positive but unquantifiable viral load by the reference method (<10 IU/mL) but this case was detected by the Xpert FS assay (positive <40 IU/mL).

Sensitivity was further assessed using three additional viral load thresholds (Table 3) and was 100% for all of them (quantifiable ≥ 10 IU/mL, ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL). For a sample with a viral load of 5.54 Log (IU/mL) in plasma, the viral load was not quantified by the Xpert FS assay due to an error in assay controls, and the HCV amplification curve was validated manually as positive (qualitative result).

Table 2
Sensitivity and specificity of the RNA-PoCT and the DBS-based assay.

	Xpert VL (plasma)		Total
	Detected	Undetected	
RNA-PoCT			
Detected	62	0	62
Undetected	1	37	38
Total	63	37	100
DBS-based assay			
Detected	59	0	59
Undetected	4	37	41
Total	63	37	100

Table 3
Sensitivity of the RNA-PoCT and the DBS-based assay according to HCV viral load.

HCV viral load threshold in plasma	RNA-PoCT		DBS assay		p-value
	Proportion	% (95% CI)	Proportion	% (95% CI)	
Detectable	62/63	98.4 (91.5–99.7)	59/63	93.7 (84.8–97.5)	0.365
Quantifiable ≥ 10 IU/mL	61/61	100 (94.1–100)	59/61	96.7 (88.8–99.1)	0.476
Quantifiable ≥ 1000 IU/mL ^a	60/60	100 (94.0–100)	59/60	98.3 (91.1–99.7)	1.000
Quantifiable ≥ 3000 IU/mL ^b	59/59	100 (93.4–99.1)	58/59	98.3 (91.0–99.7)	1.000

CI, Confidence Interval; DBS, Dried Blood Spot; IU, International Units; RNA-PoCT, Xpert HCV VL Fingerstick assay.

^a In specific settings, a qualitative HCV-RNA assay with a lower limit of detection ≤ 1000 IU/mL can be used to provide broad affordable access to HCV diagnosis and care (European Association for the Study of the Liver, 2018).

^b An HCV-RNA assay with a limit of detection of 3000 IU/mL or lower would be acceptable and identify 95% of those with viremic infection (World Health Organization, 2018).

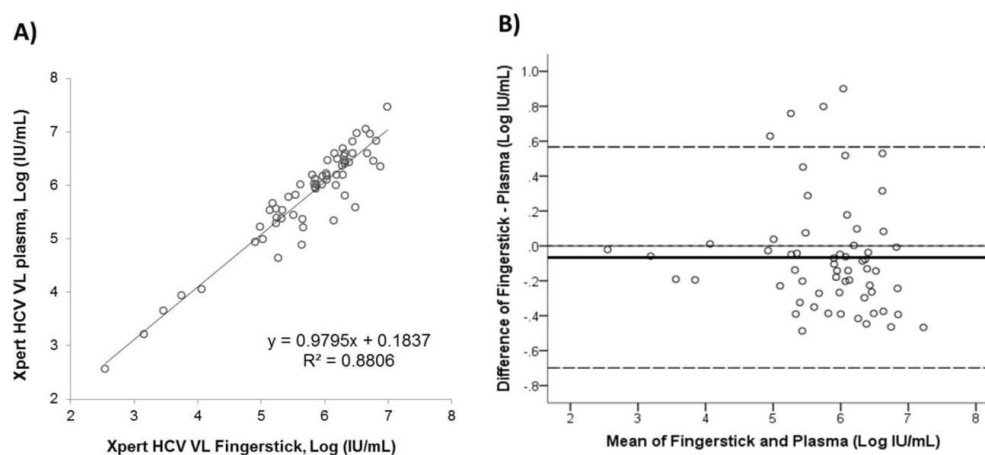


Fig. 2. Agreement of quantitative results between the Xpert FS and Xpert VL assays. A) Correlation between viral loads. B) Bland-Altman bias plot of differences of the Xpert FS minus Xpert VL viral loads in participants with quantifiable results by both assays ($n = 60$). The black line represents the existing bias of -0.0659 Log (IU/mL) in viral loads of the Xpert FS in comparison with the Xpert VL assay; dashed lines represent the 95% limits of agreement of -0.69898 to 0.56718 .

The mean viral load of the 60 participants with quantified results by both the reference method and the Xpert FS assay was 5.82 Log(IU/mL) [range 2.56 – 7.46 Log(IU/mL)] and 5.75 Log(IU/mL) [range, 2.54 – 6.99 Log(IU/mL)], respectively. The correlation between viral load results obtained by both methods was significant (Spearman's Rho, $\rho = 0.87$), as shown in Fig. 2A. The Bland-Altman plot (Fig. 2B) showed a bias of -0.0659 Log (IU/mL) of the Xpert FS assay compared to the reference method, with 95% limits of agreement of -0.69898 to 0.56718 , indicating slightly lower viral loads with the fingerstick than with the plasma-based assay. Four samples were over the upper limit of agreement, with a higher viral load by the Xpert FS assay than with the reference method.

For 12 participants an error was obtained while the Xpert FS assay was running and required a repeat test: (i) for nine participants the assay aborted once, while for one participant it aborted three times due to volume errors; (ii) in one case, an invalid result was obtained due to the cycle threshold of the controls being too high and no incidents were observed in the repeat test; and (iii) in another case an invalid result was obtained due to the failure of controls, but the result was manually validated as qualitatively positive (not quantifiable) following technical service's recommendations. Overall, a total of 113 cartridges were required to generate valid results for the 100 participants (11.5% of the cartridges failed). Regarding volume errors, no obvious trend was observed over time (1/31 participants in the first, 8/36 in the second and 2/33 in the third study quarters) or among the four people performing the test. In addition to remote validation of tests results from the

laboratory in the present study, laboratory staff also acted as intermediaries between the DCR staff and technical support experts in some instances regarding trouble-shooting with the GeneXpert® System (software or barcode reader) helping to solve sporadic incidents in real time.

DBS-based assay

All DBS samples were rated as adequate for HCV-RNA testing as spots showed good quality (no change in the humidity indicator) and quantity (diameter and number of the spots) in all cases. As results were not delivered to participants, samples were stored at room temperature for a mean of 18.2 days (standard deviation, 9.5 days) before being processed in batches. For two participants (2.0%), an invalid result in DBS testing was obtained, which was resolved after re-testing.

The concordance between the DBS-based assay and the Xpert VL assay in plasma as the reference method was very good (Kappa = 0.916). Specificity was 100% (95% CI, 90.1%–100%), as no false positive result was obtained in comparison with the reference method, and sensitivity was 93.7% (95% CI, 84.8–97.5) (Table 2). The sensitivity was also assessed using the same three additional viral load thresholds as for the Xpert FS assay (Table 3). Sensitivity was 96.7% for the ≥ 10 IU/mL threshold, and 98.3% for both the ≥ 1000 and the ≥ 3000 IU/mL thresholds.

When the sensitivity of the DBS assay was compared with the sensitivity of the Xpert FS assay at each viral load threshold, using the Xpert VL assay as the reference method in both cases, the differences were not statistically significant (Table 3).

Influence of the HCV genotype and HIV infection on HCV-RNA detection

HCV could not be genotyped in the two participants with viral loads <10 IU/mL in plasma (2/63, 3.2%). In the remaining cases, the HCV genotype and subtype were assigned by sequencing, except for one case that failed and was tested with the Abbott HCV Genotype II assay (viral load, 1650 IU/mL). The HCV genotypes and subtypes identified were as follows: 3a ($n = 31$; 50.8%), 1a ($n = 24$; 39.3%), 1b ($n = 2$; 3.3%), 4a ($n = 2$; 3.3%), and 4d ($n = 2$; 3.3%). As false negative results with the Xpert FS assay were obtained only in one case, which was one of those two participants with a viral load <10 IU/mL, no effect of the HCV genotype/subtype on Xpert FS assay sensitivity could be identified. These two participants with viral loads <10 IU/mL in plasma were also false negative by the DBS assay. The remaining two false negative cases obtained by the DBS assay were classified as subtype 3a, but in both cases a rather low viral load was present (364 and 4530 IU/mL in plasma, respectively), while all other samples with subtype 3a were correctly detected (viral loads, $1650\text{--}2.9 \times 10^7$ IU/mL).

Similarly, no effect of HIV co-infection could be observed on the qualitative results of both the Xpert FS and the DBS assays. The prevalence of HIV infection was similar in the HCV-RNA positive and negative groups: 25.8% (16/62) vs. 29.0% (11/38) for the Xpert FS assay, $p = 0.911$; and 25.0% (15/60) vs. 30.0% (12/40) for the DBS-based assay, $p = 0.583$.

Delivery of HCV-RNA results and preferences in this regard

Provisional Xpert FS assay results were delivered to all 100 participants, and on the same day of testing in 80.0% of the cases. Among the 20 cases in which results were delivered on a different day, delivery took place between 1 and 8 days later (median, 3 days) when they came back to the DCR. Among the 11 participants that required repeated testing, eight out of 11 (72.7%) received the Xpert FS result on the same day of testing vs. 72 out of 89 (80.9%) that received the result in a different day ($p = 0.765$). Confirmed results (reference method) were available on the next working day and delivered to all 100 participants at a second visit to the DCR between 1 and 84 days (median, 7 days; interquartile range, 5–11 days). Referral to care was then initiated for all those who required treatment and were not already linked to care (62/63 viremic cases, 98.4%).

When participants were asked about their preferences (Fig. 3), 50.0% of the participants preferred to receive the result on the same day even if they had to wait for an hour; 13.0% preferred to receive results another day when coming back to the DCR; and 37.0% did not express a preference. When awareness of HCV status (either viremic or not) was taken into account, same-day delivery of results was preferred by 59.4% of those unaware and by 33.3% of those aware of their status,

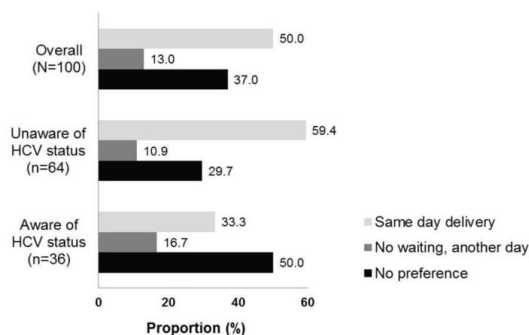


Fig. 3. Participants' preferences on receiving HCV-RNA testing results. Preferences were significantly different ($p = 0.041$) according to awareness of HCV status, either viremic or not.

($p = 0.012$). When considering only viremic participants, these proportions were 58.8% vs. 34.5%, respectively ($p = 0.054$).

Discussion

This study demonstrates that both the use of the Xpert FS PoCT or the HCV-RNA assay from on-site collected DBS samples are highly reliable tools for the simplified diagnosis of viremic HCV infection among current PWID. Furthermore, these could greatly improve the diagnosis strategy currently used at the HRS network in Catalonia (Ab-PoCT followed by referral to care of seropositive individuals for diagnosis confirmation in venous blood).

The Xpert FS assay showed an excellent real-world clinical performance for HCV-RNA detection (98.4% sensitivity and 100% specificity) among the population of current PWID attending a DCR in Barcelona. These results align with a previous field-based evaluation of this assay among individuals attending homeless and drug health services in Australia (one third of whom had a history of drug injection) (Lamoury et al., 2018), showing 98.3% sensitivity and 100% specificity for HCV-RNA detection when compared with the Abbott HCV RealTime assay (LOD of 12 IU/mL in comparison with 4 IU/mL for the Xpert VL assay used in our study). In both studies, the only discrepant result obtained for detectable results was below the LoQ of plasma assays and, thus, not likely to be clinically meaningful as most HCV-infected individuals have viral loads over 2 Log(IU/mL) at diagnosis (Alonso, Pérez-García, Ampuero, Reigadas & Bouza, 2017; Gupta, Agarwala, Kumar, Maiwall & Sarin, 2017). Also in line with Lamoury et al., the difference between HCV-RNA viral loads detected by the Xpert FS and the gold standard viral load method were minimal in both studies (-0.07 Log(IU/mL)). In another field evaluation in people with a history of injecting drug use attending an opioid agonist therapy clinic in Tanzania (Mohamed et al., 2019), sensitivity and specificity were 99.1% (one false negative with 6.2 Log IU/mL) and 98.7% (one false positive with 5.7 Log IU/mL), respectively, and a mean difference of 0.13 IU/mL in comparison with the Xpert VL assay.

Additionally, 19.5% (43/220) of participants required re-testing in the latter study (Mohamed et al., 2019), mostly due to volume errors. It is also important to bear in mind that capillary blood was collected and loaded into the cartridge by the clinic personnel, but cartridges were then transported (10-minute walking distance with high temperature and humidity conditions) to the central laboratory for testing by laboratory personnel. In the present study, 12% of participants required repeat testing. While no specific factor was identified as being associated with the Xpert FS test errors observed, they might have been due to several reasons, including: i) that the tests were performed by four different people belonging to the DCR staff with no previous laboratory experience (error rates were 8.1% or 2.8% in Australian studies where one trained operator performed the tests (Grebely et al., 2020; Lamoury et al., 2018)); ii) the presence of highly dense blood in some individuals (possibly due to dehydration in PWID); and iii) the use of research-use-only cartridges (Lamoury et al., 2018; Mohamed et al., 2019). When healthcare workers without expertise in laboratory tasks are involved in testing, they should be optimally trained to ensure the quality of the process (Grebely et al., 2017), and the presence of support from a reference laboratory is also advised to help them solve incidents in real time.

Similarly to the study by Mohamed et al. (2019), the present results were obtained in a setting with a higher HCV-RNA prevalence (60.6 and 63.0%) in comparison to the Australian study (40.5%) (Lamoury et al., 2018), and the presence of HCV/HIV co-infection (36.2% and 25.4%), which was not reported in the Australian study. No effect of HIV co-infection was observed on the qualitative results of the Xpert FS assay in the present study. Additionally, the HCV genotypes most commonly circulating among PWID in Spain are represented herein (genotyping data was partial in the Tanzanian study and lacking in the Australian study), and Xpert FS testing performed by the nursing personnel of the

DCR (laboratory personnel performed the whole Xpert FS testing procedure in the Australian study and operated the GeneXpert in the Tanzanian study), which highlights the major strength of this study: performance of the whole Xpert FS testing procedure in a real-world setting.

This is the first study to compare the clinical performance of the Xpert FS assay with a DBS-based assay for HCV-RNA detection. Given the reduced analytical sensitivity of the in-house DBS-based assay (LoD, 541 IU/mL of whole blood) in comparison to the Xpert FS assay (LoD, 35 IU/mL), 3/62 viremic cases were missed by the first assay in comparison with the second one (viral loads in fingerstick blood: positive < 100 IU/mL, 347 and 2920 IU/mL). However, when compared to the reference method in plasma, the difference between the clinical sensitivity of the DBS and the Xpert FS assays was not statistically significant for any of the four viral load thresholds assessed (detectable, quantifiable ≥ 10 IU/mL, quantifiable ≥ 1000 IU/mL and quantifiable ≥ 3000 IU/mL). Additionally, when either the quantifiable ≥ 1000 or ≥ 3000 IU/mL thresholds were used, as recommended by EASL (European Association for the Study of the Liver, 2018) and WHO guidelines (World Health Organization, 2018), respectively, for those assays improving access to and affordability of HCV diagnostics, only one viremic participant was missed by the DBS assay in comparison with the Xpert FS assay. Furthermore, no effect on the sensitivity of the DBS assay due to the HCV genotype or the HIV co-infection was observed in this study in agreement with our previous results (Saludes et al., 2019a). These results add to previous evidence showing a high diagnostic accuracy of the HCV-RNA detection assays in DBS samples (Lange et al., 2017; Vázquez-Morón et al., 2019), especially with viral loads above 1000 IU/mL (Catlett et al., 2019; Saludes et al., 2019a; Shepherd, Baxter & Gunson, 2019).

Unlike DBS-based testing, the Xpert FS assay is an instrumented PoCT assay that facilitates same-day diagnosis of viremic infection. Nevertheless, the rate and time to delivery of the Xpert FS assay results have not been previously evaluated. Results in this study were delivered to 100% of the participants and on the same day of testing in 80.0%. Test repeating due to errors had no statistically significant influence on same day delivery of results in comparison with no repeating. While waiting for their results, some of the participants consumed drugs in the DCR while others spent time in the center's coffee room where basic food was available. Interestingly, when the preferences of PWID were taken into account, 50.0% of them preferred same-day delivery of HCV-RNA testing results, indicating that this was not a priority for many participants. This proportion is somewhat lower than that found by Bajis et al. (63%) (Bajis et al., 2018). Contrary to common belief, getting their results on the next visit at the HRS might not be a barrier for PWID that are regular users of these services. While DBS results were not delivered to participants in this study, delivery of confirmatory test results at a return visit was feasible for 100% of the participants. However, this proportion may vary depending on the time to result in different settings and the use of incentives. Economic incentivization has been shown to improve linkage to care and treatment among PWID (Norton et al., 2019; Ward et al., 2019). Even if DBS results would have to be delivered upon a second visit, the DBS-based strategy would still avoid the need to have several appointments at mainstream healthcare centers for everything from phlebotomy to the delivery of test results. Given the associated costs with HCV-RNA PoCT in Spain, and considering the simplicity of DBS collection, storage and transportation to centralized laboratories, DBS testing could be a useful and reliable alternative for the identification of viremic individuals at HRS where the Xpert FS testing is neither affordable nor feasible. This may be due to space requirements, power supply, Internet connectivity for remote validation of results, and the availability of personnel who are able to perform testing.

As previously suggested, since no single testing strategy is likely to reach all people affected, different screening strategies could be used depending on the setting, targeted population, model of care, and

relative costs (Chevaliez, 2019; Lazarus et al., 2019a). In line with our results, the Spanish Society for the Study of the Liver has recently expressed that in order to reach hepatitis C elimination in Spain, decentralized diagnosis (which includes the use of a DBS-based testing or an HCV-RNA PoCT) should be promoted in marginalized populations that seldom attend mainstream healthcare services, such as PWID (Crespo et al., 2019). This will also contribute to reducing late presentation to care (Lazarus et al., 2019b).

Thus, both RNA-PoCT and DBS strategies would potentially reduce the number of individuals lost to follow-up during the diagnostic process and, consequently, increase the number of HCV-infected PWID that are aware of their status and that can be linked to care. As a result of the present intervention, 54.8% of the viremic participants became aware of their status, and 98.4% of viremic cases that were not previously linked to care were referred to care. However, the assessment of effective linkage to care by following up participants was beyond the scope of this study. Future studies should demonstrate if on-site screening at HRS (either by RNA-PoCT or DBS) increases linkage to care among this population. In this regard, efforts are being made to shorten the time to obtain the HCV-RNA result by the Xpert FS assay (Grebely et al., 2020), but the idea that a more rapid time to diagnosis will enhance linkage to treatment must be demonstrated. Additionally, the need for remote validation of Xpert FS assay results from a central laboratory may be a limitation in this respect when trained laboratory staff is not involved in the actual testing.

International guidelines have suggested that direct testing for HCV-RNA and near-patient testing could be considered to replace screening based on anti-HCV antibody testing if the screening strategy is cost-effective (European Association for the Study of the Liver, 2018). In line with this, Scott et al. (2017) demonstrated that replacing the use of the Ab-PoCT by an RNA-PoCT increased healthcare cost-savings and increased incidence reduction among PWID in Australia in comparison with other scenarios. The high HCV seroprevalence observed in the study population (89.0%) evidences that referring all seropositive cases to care presents a high workload for DCR personnel with the current strategy in Catalonia. Direct screening for HCV-RNA would allow DCR personnel to focus on referral to care only for those PWID who are in need of antiviral treatment (63.0% HCV-RNA prevalence). This is especially important as the number of cured PWID carrying HCV antibodies will increase with the wider use of HCV antiviral therapies (Grebely et al., 2019; Iversen et al., 2019). Nevertheless, local cost-effectiveness studies should be performed to establish whether the HCV-RNA PoCT or the DBS-based assay could either replace the Ab-PoCT test usually offered in the Catalan HRS settings (one-step strategy) or complement it as a reflex test following a positive Ab-PoCT (two-step strategy). These studies should take into account the number of viremic cases with undetectable antibody levels by the Ab-PoCT that may be missed by a two-step strategy either due to acute infection or negative results of the Ab-PoCT (3.2% in this study as detected both by the RNA-PoCT and DBS assays, and 4.1% in our previous study in HRS) (Saludes et al., 2019a).

This study has several limitations. Firstly, the clinical performance of the Xpert FS and DBS-based tests and delivery of results observed in this study may not be generalizable to other settings. It should be considered that this study was performed in PWID engaged in harm reduction by directly testing for HCV-RNA (one-step diagnosis strategy) in a population with a high prevalence of viremic HCV infection (63.0%), including HCV genotypes commonly circulating among PWID in Spain (that is, genotypes 5 and 6 were not represented), and using economic incentives. Secondly, the linkage to care of participants after receiving HCV-RNA test results was not assessed. In a previous study in the same DCR assessing linkage to care after 6 months of receiving the results, 46.9% attended primary or specialist care but none started treatment (Saludes et al., 2018b). Since the last quarter of 2018, a pilot HCV micro-elimination study is ongoing at the DCR participating in this study, with on-site testing (using the Xpert FS assay) and treatment, as

V. Saludes, et al.

International Journal of Drug Policy 80 (2020) 102734

well as monitoring for reinfection (using DBS samples) (Lens et al., 2020). Further studies should evaluate the rate of same-day delivery of Xpert FS results and linkage to care after Xpert or DBS testing in different situations as well as their cost-effectiveness.

In conclusion, the one-step HCV-RNA PoCT diagnosis strategy evaluated at the DCR increased PWID awareness of their HCV status and allowed for the timely and reliable identification of potential treatment candidates. Given its high accuracy and that it was a PoCT, the use of the Xpert FS assay could facilitate the implementation of decentralized HCV test-and-treat micro-elimination strategies in PWID attending HRS, including decentralized diagnosis (on-site HCV-RNA testing and delivery of test results), followed by non-invasive fibrosis assessment, and treatment supervision (treatment administration, adherence support, and evaluation of treatment outcome and reinfection). Additionally, in centers where the use of the RNA-PoCT is not feasible, DBS testing could be an alternative. Regardless of whether the RNA-PoCT or the DBS-based testing is performed, quality assurance programs should be established (Grebely et al., 2017; Saludes et al., 2019a). Obtained data will be critical for guiding efforts towards HCV elimination among PWID in the context of the Plan for the Prevention and Control of Hepatitis C in Catalonia (Comissió per a l'elaboració del pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya, 2018) and will be instrumental in achieving WHO's elimination targets.

CRedit authorship contribution statement

V. Saludes: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **A. Antuori:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **J.V. Lazarus:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **C. Folch:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **S. González-Gómez:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **N. González:** Resources, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **N. Ibáñez:** Visualization, Writing - review & editing. **J. Colom:** Visualization, Writing - review & editing. **L. Matas:** Resources, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **J. Casabona:** Visualization, Writing - review & editing. **E. Martró:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Interest

VS: travel sponsorship to attend scientific meetings from Gilead Sciences and Cepheid. JVL: speaking and grant support from Gilead Sciences; advisory committee and grant support from AbbVie; speaking and grant support from MSD; advisory committee of Janssen; speaking fee from Cepheid, outside the submitted work. EM: advisory board member, research grants, speaking fees as well as travel sponsorship for meetings from Gilead Sciences; research grants and travel sponsorship for presentation of results at meetings from Abbott GmbH & Co. KG; speaking fees and grant support from Cepheid. The other authors have no competing interests to declare.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge and thank to the participants who have generously participated in this study. The authors also thank all the other professionals at HRS that have collaborated in this study: Dulce García, Vicente Cruz, Judit Rebollo, and Laura Quesada.

This study was partially funded by Cepheid Inc (CA, USA), but Cepheid had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This study was also funded by the Instituto de Salud Carlos III/FEDER, European Union

(grant number PI15/000284, 2016-2018). EM and JVL hold a Miguel Servet position for researchers in the Spanish National Health System (Instituto de Salud Carlos III/FSE, European Union, grant numbers CPII15/00028 (2016-2019) and CP18/00074 (2019–2022), respectively). The authors thank the CERCA Program/Generalitat de Catalunya for their support to the Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP) and the Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal). JVL further acknowledges support from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023” Programme (CEX2018-000806-S).

References

- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2018). *Sistema d'informació sobre Drogodependències a Catalunya*. Generalitat de Catalunya. Informe anual 2017. Retrieved 1st October 2019 from http://drogues.gencat.cat/web/content/ministre/drogues/professionals/epidemiologia/docs/SIDC-Informe-2017-FINAL_181022.pdf.
- Alonso, R., Pérez-García, F., Ampuero, D., Reigadas, E., & Bouza, E. (2017). New direct-acting antivirals for patients with chronic HCV infection: Can we monitor treatment using an HCV core antigen assay? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3), 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.010>.
- Applegate, T. L., Fajardo, E., & Sacks, J. A. (2018). Hepatitis C virus Diagnosis and the Holy Grail. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(2), 425–445. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.02.010>.
- Bajis, S., Maher, L., Treloar, C., Hajarizadeh, B., Lamoury, F. M. J., Mowat, Y., ... Grebely, J. (2018). Acceptability and preferences of point-of-care finger-stick whole-blood and venepuncture hepatitis C virus testing among people who inject drugs in Australia. *The International Journal of Drug Policy*, 61, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2018.08.011>.
- Catlett, B., Carrera, A., Starr, M., Applegate, T. L., Lowe, P., Grebely, J., et al. (2019). Performance evaluation of the Hologic Aptima HCV Quant Dx assay for detection of HCV RNA from dried blood spots. *Journal of Clinical Virology*, 112, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.01.010>.
- Cepheid. (2019). *Cepheid solutions. Xpert® HCV VL Fingerstick*. Retrieved 1st November 2019 from <https://www.cephheid.com/en/cephheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hcv-vl-fingerstick>.
- Cepheid. (2019). *Cepheid solutions. Xpert® HCV Viral Load*. Retrieved 1st November 2019 from <https://www.cephheid.com/en/cephheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hcv-viral-load>.
- Chevaliez, S. (2019). Strategies for the improvement of HCV testing and diagnosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(5), 341–347. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1604221>.
- Cooke, G. S., Andrieux-Meyer, I., Applegate, T. L., Atun, R., Burry, J. R., Cheinquer, H., ... Wiktor, S. Z. (2019). Accelerating the elimination of viral hepatitis: A Lancet Gastroenterology and Hepatology Commission. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(2), 135–184. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30270-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30270-X).
- Crespo, J., Albillós, A., Buti, M., Calleja, J. L., García-Samaniego, J., Hernández-Guerra, M., ... Sánchez Antolín, G. (2019). Eliminación de la hepatitis C. Documento de posicionamiento de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). *Gastroenterología y Hepatología*, 42(9), 579–592. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2019.09.002>.
- Dean, A. G., Sullivan, K. M., & Soe, M. M. (2013). *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. Retrieved 15th February 2020 from www.OpenEpi.com.
- Dougllass, C. H., Pedrana, A., Lazarus, J. V., 't Hoen, E. F. M., Hammad, R., Leite, R. B., ... Hellard, M. (2018). Pathways to ensure universal and affordable access to hepatitis C treatment. *BMC Medicine*, 16(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1162-z>.
- Harris, M., McDonald, B., & Rhodes, T. (2014). Hepatitis C testing for people who inject drugs in the United Kingdom: Why is uptake so low? *Drugs: Education, Prevention and Policy*, 21(4), 333–342.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2019). *Hepatitis C: New Models of Care for Drugs Services*. Lisbon: EMCDDA. Retrieved August 1st, 2019 from http://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/hepatitis-c-models-of-care_en#panel7.
- European Association for the Study of the Liver. (2018). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *Journal of Hepatology*, 69(2), 461–511 Epub.
- Fernández-López, L., Folch, C., Majó, X., Gasulla, L., & Casabona, J. (2016). Implementation of rapid HIV and HCV testing within harm reduction programmes for people who inject drugs: A pilot study. *AIDS Care*, 28(6), 712–716. <https://doi.org/10.1080/09540121.2016.1164290>.
- Folch, C., Casabona, J., Espelt, A., Majó, X., Meroño, M., Gonzalez, V., ... Brugal, MT (2016). High prevalence and incidence of HIV and HCV among new injecting drug users with a large proportion of migrants—Is prevention failing? *Substance Use & Misuse*, 51(2), 250–260. <https://doi.org/10.3109/10826084.2015.1092991>.
- Grebely, J., Applegate, T. L., Cunningham, P., & Feld, J. J. (2017). Hepatitis C point-of-care diagnostics: In search of a single visit diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(12), 1109–1115. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1400385>.
- Grebely, J., Catlett, B., Jayasinghe, I., Valerio, H., Hajarizadeh, B., Verich, A., ... Applegate, T. L. (2020). Time to detection of hepatitis C infection with the Xpert HCV viral load Fingerstick point-of-care assay: Facilitating a more rapid time to diagnosis. *Journal of Infectious Diseases*, *jiaa037*. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa037>.
- Grebely, J., Lamoury, F. M. J., Hajarizadeh, B., Mowat, Y., Marshall, A. D., Bajis, S., ...

- Applegate, T. L. (2017). Evaluation of the Xpert HCV viral load point-of-care assay from venepuncture-collected and finger-stick capillary whole-blood samples: A cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2(7), 514–520. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30075-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30075-4).
- Grebely, J., Larney, S., Peacock, A., Colledge, S., Leung, J., Hickman, M., ... Degenhardt, L. (2019). Global, regional, and country-level estimates of hepatitis C infection among people who have recently injected drugs. *Addiction (Abingdon, England)*, 114(1), 150–166. <https://doi.org/10.1111/add.14393>.
- Gupta, E., Agarwala, P., Kumar, G., Maiwall, R., & Sarin, S. K. (2017). Point-of-care testing (POCT) in molecular diagnostics: Performance evaluation of Genexpert HCV RNA test in diagnosing and monitoring of HCV infection. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 88, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.01.006>.
- Iversen, J., Dore, G. J., Catlett, B., Cunningham, P., Grebely, J., & Maher, L. (2019). Association between rapid utilisation of direct hepatitis C antivirals and decline in the prevalence of viremia among people who inject drugs in Australia. *Journal of Hepatology*, 70(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.030>.
- Lamoury, F. M. J., Bajis, S., Hajarizadeh, B., Marshall, A. D., Martinello, M., Ivanova, E., ... Grebely, J. (2018). Evaluation of the Xpert HCV viral load finger-stick point-of-care assay. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(12), 1889–1896. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy114>.
- Lange, B., Roberts, T., Cohn, J., Greenman, J., Camp, J., Ishizaki, A., ... Easterbrook, P. (2017). Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples – A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 17(51), 693. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2776-z>.
- Lazarus, J. V., Pericás, J. M., Picchio, C., Cernosa, J., Hoekstra, M., Luhmann, N., ... Dillon, J. F. (2019a). We know DAA's work, so now what? Simplifying models of care to enhance the hepatitis C cascade. *Journal of Internal Medicine*, 286(5), 503–525. <https://doi.org/10.1111/joim.12972>.
- Lazarus, J., Safreed-Harmon, K., Thursz, M., Dillon, J., El-Sayed, M., Elsharkawy, A., ... Colombo, M. (2018). The micro-elimination approach to eliminating hepatitis C: Strategic and operational considerations. *Seminars in Liver Disease*, 38(3), 181–192. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1666841>.
- Lazarus, J. V., Picchio, C., Dillon, J. F., Rockstroh, J. K., Weis, N., & Buti, M. (2019b). Too many people with viral hepatitis are diagnosed late - with dire consequences. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(8), 451–452. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0177-z>.
- Lens, S., Miralpeix, A., Gálvez, M., Martró, E., González, N., Rodríguez-Tajes, S., et al. (2020). Poster 130. Decentralized model of screening and access to hepatitis C treatment in the largest harm reduction center in Barcelona. *45th Annual Congress of the Spanish Association for the Study of the Liver February 12–14*.
- Llibre, A., Shimakawa, Y., Mottez, E., Ainsworth, S., Buivan, T.-P., Firth, R., ... Duffy, D. (2018). Development and clinical validation of the Genedrive point-of-care test for qualitative detection of hepatitis C virus. *Gut*, 67(11), 2017–2024. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315783>.
- Martró, E., González, V., Buckton, A. J., Saludes, V., Fernández, G., Matas, L., ... Ausina, V. (2008). Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 192–197. <https://doi.org/10.1128/JCM.01623-07>.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L., & Simmonds, P. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: Implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *The Journal of General Virology*, 76(10), 2493–2507. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-10-2493>.
- Mohamed, Z., Mbawambo, J., Rwegasha, J., Mgina, N., Doulla, B., Mwakale, P., ... Lemoine, M. (2019). In-field evaluation of Xpert® HCV viral load Fingerstick assay in people who inject drugs in Tanzania. *Liver International*, 40(3), 514–521. <https://doi.org/10.1111/liv.14315>.
- Norton, B. L., Bachhuber, M. A., Singh, R., Agyemang, L., Arnsen, J. H., Cunningham, C. O., et al. (2019). Evaluation of contingency management as a strategy to improve HCV linkage to care and treatment in persons attending needle and syringe programs: A pilot study. *International Journal of Drug Policy*, 69, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2019.02.009>.
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2018). *Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC)*. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Retrieved from [http://www.msbs.gob.es/ciudadanos/en/Lesiones/en/Transmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITIS/ docs/Plan_Estrategico_Abordaje_Hepatitis_C_\(PEAHC\).pdf](http://www.msbs.gob.es/ciudadanos/en/Lesiones/en/Transmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITIS/ docs/Plan_Estrategico_Abordaje_Hepatitis_C_(PEAHC).pdf).
- Saludes, V., Antuori, A., Folch, C., González, N., Ibáñez, N., Majó, X., ... Martró, E. (2019a). Utility of a one-step screening and diagnosis strategy for viremic HCV infection among people who inject drugs in Catalonia. *International Journal of Drug Policy*, 74, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2019.10.012>.
- Saludes, V., Antuori, A., Reinhardt, B., Viciana, I., Clavijo, E., Schreiber, L., ... Martró, E. (2019b). Reliable resolution of ambiguous hepatitis C virus genotype 1 results with the Abbott HCV Genotype Plus RUO assay. *Scientific Reports*, 9(1), 3678. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40099-3>.
- Saludes, V., Folch, C., Antuori, A., González, N., García, D., Anoro, M., et al. (2018b). Universal on-site HCV RNA screening is warranted among PWID who attend harm reduction centres in Catalonia, Spain. *7th International Symposium on Hepatitis Care in Substance Users (INHSU) 19 - 21 September 2018*.
- Saludes, V., Folch, C., Morales-Carmona, A., Ferrer, L., Fernàndez-López, L., Muñoz, R., ... Martró, E. (2018a). Community-based screening of hepatitis C with a one-step RNA detection algorithm from dried-blood spots: Analysis of key populations in Barcelona, Spain. *Journal of Viral Hepatitis*, 25(3), 236–244. <https://doi.org/10.1111/jvh.12809>.
- Schröder, S. E., Pedrana, A., Scott, N., Wilson, D., Kuschel, C., Aufegger, L., ... Howell, J. (2019). Innovative strategies for the elimination of viral hepatitis at a national level: A country case series. *Liver International*, 39(10), 1818–1836. <https://doi.org/10.1111/liv.14222>.
- Scott, N., Doyle, J. S., Wilson, D. P., Wade, A., Howell, J., Pedrana, A., ... Hellard, M. E. (2017). Reaching hepatitis C virus elimination targets requires health system interventions to enhance the care cascade. *International Journal of Drug Policy*, 47, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2017.07.006>.
- Comissió per a l'elaboració del pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya. (2018). *Pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya*. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Retrieved from http://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspac/vigilancia_salut_publica/vih-sida-its/04/Hepatitis_viriques/Pla-Hepatitis-Definitiu_C_DEF.pdf.
- Shepherd, S. J., Baxter, R. E., & Gunson, R. N. (2019). Evaluation of the Abbott m2000 system for dried blood spot detection of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Virology*, 110, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.008>.
- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2019). *Sistema d'informació sobre Drogodependències de Catalunya*. Generalitat de Catalunya. Informe anual 2018. Retrieved 4th October 2019 from http://drogues.gencat.cat/web/.content/minisite/drogues/professionals/epidemiologia/docs/Informe_2018_SIDC_ok.pdf.
- Vázquez-Morón, S., Ardizzone Jiménez, B., Jiménez-Sousa, M. A., Bellón, J. M., Ryan, P., & Resino, S. (2019). Evaluation of the diagnostic accuracy of laboratory-based screening for hepatitis C in dried blood spot samples: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 7316. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41139-8>.
- Ward, K. M., Falade-Nwulia, O., Moon, J., Sutcliffe, C. G., Brinkley, S., Haseluhn, T., ... Sulkowski, M. S. (2019). A Randomized controlled trial of cash incentives or peer support to increase HCV treatment for persons with HIV who use drugs: The champs study. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(4), ofz166. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz166>.
- World Health Organization. (2016). *Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>.
- World Health Organization. (2018). *Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection*. Geneva: World Health Organization. Retrieved 1st August 2019 from <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2018/en/>.



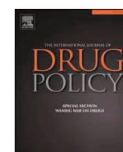
Artículo II





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Drug Policy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/drugpo

Research Paper

Evaluation of the Xpert HCV VL Fingerstick point-of-care assay and dried blood spot HCV-RNA testing as simplified diagnostic strategies among people who inject drugs in Catalonia, Spain



V. Saludes^{a,b,c,d}, A. Antuori^{a,b,c}, J.V. Lazarus^e, C. Folch^{d,f}, S. González-Gómez^{a,b,c}, N. González^g, N. Ibáñez^h, J. Colomⁱ, L. Matas^{a,b,c,d}, J. Casabona^{d,f}, E. Martró^{a,b,c,d,s}

^a Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^b Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

^c Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^e Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^f Centre for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia (CEEISCAT), Public Health Agency of Catalonia (ASPCAT), Badalona, Spain

^g Drug consumption room "El Local", IPSS Foundation, Sant Adrià del Besòs, Barcelona, Spain

^h Program on Substance Abuse, ASPCAT, Barcelona, Spain

ⁱ Program for the Prevention, Control and Treatment of HIV, Sexually Transmitted Infections and Viral Hepatitis, ASPCAT, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Hepatitis C virus (HCV)
Diagnostics
HCV-RNA point-of-care test (PoCT)
Dried blood spots (DBS)
People who inject drugs (PWID)

ABSTRACT

Background: Catalonia requires decentralized and simplified strategies for the diagnosis of viremic HCV infection among people who inject drugs (PWID). We aimed to perform a direct comparison of the diagnostic performance between two, single-step strategies for the screening and diagnosis of viremic HCV infection in PWID attending a drug consumption room (DCR) in Barcelona: i) on-site HCV-RNA testing using the point-of-care test (PoCT) Xpert HCV VL Fingerstick; and ii) on-site dried blood spots (DBS) collection for HCV-RNA testing at the laboratory (in-house assay). Additionally, we aimed to assess participants' preferences in receiving HCV-RNA testing results and feasibility of same-day delivery of PoCT results.

Methods: The real-world, clinical performance of these two strategies was established in comparison with the reference method (HCV viral load testing with the Xpert HCV Viral Load assay at the laboratory from venous plasma collected at the DCR). HCV genotypes/subtypes and HIV status were also determined by sequencing and serology, respectively. A questionnaire including preferences regarding the delivery of test results was administered.

Results: The prevalence of HCV-RNA was 63.0% (of which 25.8% were co-infected with HIV). The RNA-PoCT showed a sensitivity of 98.4% for detectable viral loads (>4 IU/mL) and of 100% for quantifiable viral loads (≥ 10 , ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL). For the DBS-based assay, a sensitivity of 93.7% was obtained for detectable viral loads, 96.7% for the quantifiable ≥ 10 IU/mL threshold, and 98.3% for both the quantifiable ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL thresholds. No significant differences were detected between the sensitivity values of these two strategies, and the specificity was 100% in both cases. Half of the participants preferred to receive the HCV-RNA result on the same day, and 80% of participants received their RNA-PoCT results on the same day.

Conclusions: Both the HCV-RNA PoCT and the DBS-based assay are highly reliable tools for the simplified diagnosis of viremic HCV infection among current PWID. These strategies allow for on-site sample collection and delivery of test results, facilitating decentralized care in harm reduction services.

* Corresponding author at: Microbiology Department, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute (IGTP), Crta. del Canyet s/n 08916 Badalona, Spain.

E-mail address: emartro@igtp.cat (E. Martró).

<https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.102734>

Introduction

The World Health Organization (WHO) has set reaching 90% diagnosis and 80% treatment rates as the main targets in the effort to eliminate hepatitis C virus (HCV) infection as a major public health threat by 2030 (World Health Organization, 2016). In Spain, driven by the Strategic Plan for Tackling Hepatitis C in the National Health System, treatment rates have improved remarkably (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2018). Nevertheless, people who inject drugs (PWID), who constitute the core of the HCV epidemic in Europe (Grebely et al., 2019) as well as in Catalonia (Folch et al., 2016), still face numerous barriers in accessing mainstream healthcare services for hepatitis C confirmatory diagnosis and treatment (Fernández-López, Folch, Majó, Gasulla & Casabona, 2016).

In Catalonia, there is a comprehensive network of drug harm-reduction services (HRS), including 16 centers and six mobile units (12 of them with supervised drug consumption rooms (DCR)), that conjointly cared for over 6000 PWID in 2018 (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2019). Since 2011, these HRS have been offering on-site HCV testing with an antibody point-of-care test (Ab-PoCT), and those with a positive result are referred to the mainstream healthcare services for viral load confirmation in venous plasma and disease evaluation. Remarkably, an estimated 31% of PWID fail to attend confirmatory RNA testing (Fernández-López et al., 2016). Consequently, simplified testing strategies for the identification of viremic individuals are urgently needed in the context of HRS, which may facilitate not only decentralized diagnosis but also treatment, as a micro-elimination strategy (Lazarus et al., 2018) among PWID in Catalonia.

Governments must invest in HCV prevention, testing, and treatment to provide more comprehensive services to PWID in order to achieve the HCV elimination targets. HCV testing should be simple, high quality, affordable, and accessible within existing services caring for this collective (Cooke et al., 2019; Douglass et al., 2018; Schröder et al., 2019). Diagnosis of viremic HCV infection among PWID who attend HRS can be simplified by on-site collection of dried blood spot (DBS) samples for RNA testing in the laboratory or by using an HCV-RNA PoCT (Applegate, Fajardo & Sacks, 2018; Chevaliez, 2019).

The recently CE-marked HCV-RNA PoCT (Xpert® HCV VL Fingerstick, Cepheid; hereafter, Xpert FS) was developed to improve the diagnosis of viremic infection at the point of care, enabling the delivery of HCV-RNA results at the time of testing without the need for a follow-up visit (Cepheid, 2019a). In comparison with the previously existing Xpert HCV Viral Load assay (hereafter, Xpert VL) (Cepheid, 2019b) and the Genedrive system (Genedrive Diagnostics, Manchester, UK) which were designed to be used as HCV-RNA PoCT using either plasma or serum (Grebely, Lamoury, et al., 2017; Llibre et al., 2018), the Xpert FS assay has a faster turnaround time and uses 100 µl volume of whole blood collected by fingerstick. Consequently, common losses to follow-up among PWID who do not return to obtain their results may be reduced, and the need for venipuncture is avoided. Fingerstick testing is preferred by PWID over venipuncture mainly because fingerstick is quicker but also because PWID tend to have poor venous access and a fear of having a vein damaged (Bajis et al., 2018; Harris, McDonald, & Rhodes, 2014). Additionally, plasma separation and cold chain maintenance of clinical samples are not needed, further simplifying the testing logistics outside of hospitals and clinics.

The use of DBS has been shown to enhance HCV testing and linkage to care among PWID (Grebely et al., 2017). In the context of the HepCdetect II study, HCV-RNA testing from DBS was implemented and evaluated as a one-step screening and diagnosis strategy in four HRS in Catalonia (European Monitoring Centre for Drugs & Drug Addiction, 2019; Saludes et al., 2019a). Among them, the DCR participating in the present study is located near one of the most active drug-trafficking and consumption areas in Spain: La Mina neighborhood in Sant Adrià de Besòs, Barcelona. This center cares for the largest number of different drug users per year within the entire Catalan HRS network

(2093 users in 2017 (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2018)) and many of their users come sporadically from diverse geographical areas in Catalonia. These factors might have limited the number of users who returned and received their HCV-RNA results (results were delivered to 76% of viremic individuals) (Saludes et al., 2019a). Therefore, the use of an HCV-RNA PoCT in this setting may reduce the number of loss to follow-up (Grebely et al., 2017). The Xpert FS assay generates results in about one hour and has shown an excellent clinical performance as an HCV-RNA PoCT (Lamoury et al., 2018). However, as several factors may influence the clinical performance of diagnostic assays, such as HCV prevalence, viral loads in viremic individuals, circulating genotypes/subtypes, HIV co-infection, and the ability of the staff performing the assay, field validations performed in different settings could provide useful information for implementation purposes. Additionally, the feasibility of same-day delivery of test results should be evaluated.

The main aim of this study was to perform a direct comparison of the diagnostic performance between two single-step strategies for the screening and diagnosis of viremic HCV infection in PWID attending a DCR: 1) HCV-RNA testing at the DCR using the RNA-PoCT Xpert FS assay; and 2) DBS collection at the DCR followed by HCV-RNA testing at a central laboratory with an in-house HCV-RNA testing assay previously validated in this setting (Saludes et al., 2019a). Additionally, we aimed to assess participants' preferences on receiving HCV-RNA testing results and feasibility of same-day delivery of PoCT results.

Material and Methods

Study design and participants

This was a community-based, cross-sectional study in a convenience sample of PWID ≥ 18 years old who had injected drugs over the previous six months and were not receiving HCV treatment. Participants were recruited at a DCR in Barcelona, Spain, by their own staff one day per week (generally on Friday to accommodate the schedule of the other DCR activities). Assuming a prevalence of viremic HCV infection of 60% and a sensitivity and specificity of 100% for the Xpert FS PoCT in comparison with the reference method (HCV viral load testing with the Xpert HCV Viral Load assay at the laboratory from venous plasma collected at the DCR), 100 participants were estimated to provide a 95% confidence interval (CI) of 50.2–69.1% for the prevalence estimate and a 95% CI of 94.0–100% for the estimates of sensitivity and 91.2–100% for specificity. In order to encourage participation and study completion, an economic incentive of €6 was offered upon delivery of the confirmed test results obtained by the reference method (generally available on the next working day, i.e. Monday). Participants were recruited from May 2018 to February 2019 and provided written, informed consent. Each participant was assigned an anonymous identifying number used to link the questionnaire with tests results. The study was approved by the Ethics Committee at the Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona (Barcelona), Spain, in 2017.

Epidemiological data collection

An anonymous 27-item questionnaire administered by DCR staff at enrolment was used for data collection. It included questions regarding to socio-demographic characteristics, data regarding previous sexual behavior, injected/non-injected drug use, types of drugs consumed, imprisonment, self-reported HCV and HIV testing, previous diagnosis and treatment of HCV and HIV infections, previous diagnosis of other unspecified sexually transmitted infections, and preferences on receiving HCV-RNA results. Participants were asked to choose from the following options of receiving HCV-RNA results: receiving results on the same day, even if they had to wait for an hour, receiving results another day when returning to the center, or no expressed preference.

Training of the DCR staff

Nursing DCR staff had previously been trained for DBS collection and storage in the context of the HepCdetect II study (Saludes et al., 2019a). Regarding the procedure of the Xpert FS assay, they were newly trained by Cepheid personnel.

Clinical specimens

At recruitment in the DCR, each participant underwent fingerstick capillary blood collection for: i) HCV Ab-PoCT testing; ii) HCV RNA-PoCT testing; and iii) DBS collection for HCV-RNA detection and genotyping. Four 12 mm spots of approximately 50 µl of fingerstick capillary blood each were collected for each study participant, then dried and stored at room temperature as previously described (Saludes et al., 2019a). DBS samples were shipped to the central laboratory at room temperature the following day (Microbiology Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona). Additionally, a paired ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) venous blood sample was collected by venipuncture at the DCR, stored overnight at 4 °C, and shipped refrigerated to the central laboratory the following day, where plasma was separated by centrifugation and subjected to the reference HCV viral load method (Xpert VL). The rest of the plasma was stored at -80 °C and, in case of discordant results between the Xpert FS assay and the reference method, viral load testing was performed with a different HCV viral load assay (Abbott HCV RealTime assay, Abbott Molecular Inc.; see below). Finally, the plasma samples were also used for HIV antigen/antibody testing, and for HCV antibody testing by conventional serology when an HCV Ab-PoCT false negative result was suspected.

HCV and HIV tests

HCV Ab-PoCT. The Hepatitis C Virus Antibody Cassette test (Türklab Tibbi Malzemeler San. ve Tic. A.Ş., Çiğli/İzmir, Turkey), a CE-marked qualitative immunoassay with a sensitivity and specificity of 100%, according to the manufacturer, was used for fingerstick blood. Results were visually read in 15 min and recorded in the questionnaire.

HCV serology testing. When an HCV Ab-PoCT false negative result was suspected, the paired plasma samples were tested for antibodies against HCV with the VITROS® Anti-HCV assay (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA).

HCV RNA-PoCT. 100 µl of capillary whole-blood was collected by fingerstick according to the manufacturer's instructions and immediately tested with the Xpert FS assay on a four-module GeneXpert® System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) operated by DCR staff (assay completion time, 58 min; limit of detection -LoD-, 35 IU/mL; limit of quantification -LoQ-, 100 IU/mL). The first 67 participants were tested with a research-use-only version of the Xpert FS assay, and the last 33 cases with the CE-marked version of the assay. The research-use-only and the CE-IVD marked versions of the Xpert HCV VL Fingerstick cartridge were the same. The personnel at the DCR received direct support from the central laboratory in order to resolve incidents and remotely validate the results in real time (verification of the amplification curves of the test controls and the HCV target) using TeamViewer software (Germany, GmbH).

Reference HCV viral load method. In the laboratory, paired plasma samples were tested with the CE-IVD marked Xpert VL assay on a four-module GeneXpert® System according to manufacturer's recommendations (assay completion time, 105 min; LoD, 4 IU/mL; LoQ, 10 IU/mL). Specimens with discordant results between the Xpert FS assay or the DBS-based assay and the reference method, were further tested with the Abbott HCV RealTime assay (Abbott Molecular Inc.; LoD and LoQ, 12 IU/mL), according to the manufacturer's instructions. Laboratory technicians were blinded to the RNA-PoCT results obtained at the DCR.

HCV-RNA detection in DBS. Two 12 mm spots were subjected to elution, nucleic acid extraction, and qualitative detection of the HCV-

RNA and an internal control by an in-house reverse-transcription and duplex real-time PCR reaction in a single step (Saludes et al., 2018a).

HCV genotyping. RNA previously extracted from DBS samples was subjected to reverse-transcription as previously described (Saludes et al., 2019a). Then, NSSB amplification was performed by heminested-PCR as follows. The first PCR round was carried out with 2.5 µl of the HCV cDNA in a final reaction volume of 25 µl containing 1×PCR buffer (Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), 10 pmol of primers P1203 and P1204 (Mellor, Holmes, Jarvis, Yap & Simmonds, 1995), 0.2 mM dNTPs, and 1 U of GoTaq® Flexi G2 DNA polymerase (Promega). Thermocycler conditions of the first PCR were 94 °C for 30 s; 35 cycles at 94 °C for 30 s, 54 °C for 40 s, and 72 °C for 50 s; and a final elongation step at 72 °C for 30 s. The second PCR round was performed with 2 µl of the first PCR product in a final reaction volume of 50 µl containing 1×PCR buffer (Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), 10 pmol of primers NSSB 2' (Martró et al., 2008) and P1204, 0.2 mM dNTPs, and 1 U of GoTaq® Flexi G2 DNA polymerase (Promega). Thermocycler conditions of the second PCR were 94 °C for 5 min; 30 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 40 s, and 72 °C for 50 s; and a final elongation step at 72 °C for 30 s. Sanger sequencing and phylogenetic analysis along with reference sequences was performed as previously described (Saludes et al., 2019b). When this methodology failed to provide a valid sequence due to low viral loads, the Abbott HCV Genotype II assay (Abbott Molecular Inc.) was used from plasma samples following the manufacturer's recommendations.

HIV serology testing. Antigen and antibodies against HIV-1/2 were tested for with the VITROS® HIV Combo assay (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA).

Results delivery and referral to care

DCR professionals delivered HCV viral load and HIV serology results to participants, performed post-test counseling, and referred participants to care when needed. As this study started before the Xpert FS assay obtained CE-IVD marking, a provisional report with Xpert FS assay results was generated after remote validation from the laboratory as advised by Cepheid and delivered to participants on the same day of testing when possible. Confirmed results were available on the next working day (on Mondays) and delivered to participants at a second visit to the DCR together with HIV serology results and the economic incentive. During this second visit, referral to care was initiated for all those who were viremic and were not already linked to care. Delivery of Xpert FS assay and reference method results as well as referral to care were recorded. No follow-up was performed to assess linkage to care after referral.

Statistical analyses

HCV seroprevalence was determined from Ab-PoCT results, and the prevalence of viremic infection was derived from the HCV-RNA results obtained with the reference method. The sensitivity and specificity of the Xpert FS assay and the DBS-based assay were assessed in comparison with the results from the reference method in plasma considering all positive results above the LoD of the reference method, either quantifiable or not (detectable threshold). Sensitivity was also assessed using three additional viral load thresholds: quantifiable ≥10 IU/mL (viral load equal or above the LoQ of the reference method), quantifiable ≥1000 IU/mL (according to the recommendations of the European Association for the Study of the Liver (EASL) for HCV-RNA assays offering broad affordable access to HCV diagnosis and care (European Association for the Study of the Liver, 2018)) and quantifiable ≥3000 IU/mL (according to WHO guidelines for assays offering improved diagnostic accessibility (World Health Organization, 2018)). The 95% CI were calculated using the Wilson Score method with OpenEpi software version 3.01 (Dean, Sullivan & Soe, 2013). For detectable HCV-RNA results, agreement with the reference method was assessed by the Kappa index. For samples with quantifiable results by both the Xpert FS

Table 1
Characteristics of the study population.

Characteristics	n/N (%)
Socio-demographic characteristics	
Median age (range), years	43.9 (25–61)
Male gender	86/100 (86.0)
Foreign origin	22/100 (22.0)
Educational attainment > primary	32/99 (32.3)
Homeless*	28/100 (28.0)
Paid employment*	24/95 (25.3)
Ever been in prison	69/100 (69.0)
Bio-behavioral characteristics	
New injectors (<5 years)	21/99 (21.2)
Injection while in prison	24/100 (24.0)
Daily injection*	71/100 (71.0)
Cocaine as the most frequently injected drug*	39/99 (39.4)
Sharing of syringes	49/100 (49.0)
Sharing of other injection equipment	55/100 (55.0)
Practicing front-backloading	33/98 (33.7)
Drug snorting	61/100 (61.0)
Sharing cocaine snorting straw	42/59 (71.2)
Drug smoking	43/99 (43.4)
Currently in drug dependence treatment	53/100 (53.0)
Unprotected sex with penetration with sex worker, PWID, HIV-positive or MSM individuals**	25/94 (26.6)
Exchange of sex for drugs or money**	3/100 (3.0)
Past or current HCV infection	91/100 (91.0)
HIV infection	27/100 (27.0)
Under antiretroviral therapy	19/27 (70.4)
Self-reported sexually transmitted infections**	6/98 (6.1)

Percentages are expressed excluding missing values.

Questions were referred to ever in life except for:

* Previous 6 months;

** Previous 12 months.

assay and the reference method, correlation was assessed through regression analysis and bias by Bland-Altman plots. The sensitivity was compared between the Xpert FS assay and the DBS-based assay at each of the viral load thresholds by the Pearson's Chi-square test with Yates correction or the Fisher's exact test, as required. Participants' preferences on receiving HCV-RNA results were compared between individuals who were aware or unaware of their HCV status by the Pearson's Chi-square or Likelihood ratio tests, as required. The analyses were performed using SPSS version 17 and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Study population characteristics

Participants ($N = 100$) were mostly male (86.0%) with a median age of 43.9; 28.0% were homeless, 22.0% were migrants, 69.0% had ever been in prison, and 71.0% injected drugs daily (see Table 1). Overall, 99 participants had been previously tested for HCV (1 – 10 times); 76 participants reported having a previous HCV diagnosis; and 28 (36.8%) of them reported receiving antiviral treatment. Among the latter, 24 participants (85.7%) had completed treatment, 14 (50.0%) received interferon-based treatment, and 23 (82.1%) reported having achieved cure (six of them were currently viremic).

The prevalence was 89.0% (95% CI, 81.4 – 93.7%) for anti-HCV antibodies and 63.0% (95% CI, 53.2 – 71.8%) for viremic HCV infection. Two participants were RNA positive and Ab-PoCT negative (3.2% of the total number of viremic participants); thus, the prevalence of past or current HCV infection was 91.0%. When these two participants were tested for anti-HCV antibodies in venous plasma, one was identified as a false negative result of the Ab-PoCT and the other one as an acute infection within the antibody window period. HCV/HIV co-infection was observed in 16 (25.4%) of the participants with viremic HCV infection.

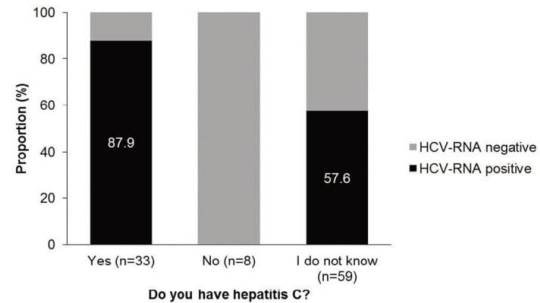


Fig. 1. Prevalence of viremic infection (HCV-RNA positive by the Xpert VL assay) according to self-reported status.

When participants were asked whether they currently had hepatitis C, 33 answered yes (none of them were undergoing antiviral treatment), 8 answered no, and 59 answered that they did not know. The proportions of viremic infection according to self-reported status are shown in Fig. 1. Overall, 39.0% of the participants were unaware of their HCV status; 34 (54.8%) of the viremic participants were unaware of having hepatitis C and five (13.5%) of the non-viremic patients believed they had hepatitis C, but they had cleared the infection. Regarding HIV infection, two (7.4%) of the HIV-positive participants were unaware of their status and, overall, 70.4% reported they were receiving antiretroviral therapy.

Real-world clinical performance of the RNA-PoCT and DBS assays

RNA-PoCT

The concordance of the Xpert FS assay with the reference method was very good (Kappa=0.979). Specificity was 100% (95% CI, 90.1% – 100%), as no false-positive result was obtained in comparison with the Xpert VL assay as the reference method, and sensitivity was 98.4% (95% CI, 91.5–99.7) (Table 2). There was one discordant result (1/63 false-negative result), which corresponded to a participant with a positive but unquantifiable viral load (<10 IU/mL) in plasma by the reference method and an undetectable result by the Xpert FS assay. The viral load of this participant was confirmed as positive in plasma by the Abbott assay (positive <12 IU/mL), and this participant had a positive Ab-PoCT result. There was another participant with a positive but unquantifiable viral load by the reference method (<10 IU/mL) but this case was detected by the Xpert FS assay (positive <40 IU/mL).

Sensitivity was further assessed using three additional viral load thresholds (Table 3) and was 100% for all of them (quantifiable ≥ 10 IU/mL, ≥ 1000 and ≥ 3000 IU/mL). For a sample with a viral load of 5.54 Log (IU/mL) in plasma, the viral load was not quantified by the Xpert FS assay due to an error in assay controls, and the HCV amplification curve was validated manually as positive (qualitative result).

Table 2
Sensitivity and specificity of the RNA-PoCT and the DBS-based assay.

	Xpert VL (plasma)		
	Detected	Undetected	Total
RNA-PoCT			
Detected	62	0	62
Undetected	1	37	38
Total	63	37	100
DBS-based assay			
Detected	59	0	59
Undetected	4	37	41
Total	63	37	100

Table 3
Sensitivity of the RNA-PoCT and the DBS-based assay according to HCV viral load.

HCV viral load threshold in plasma	RNA-PoCT		DBS assay		p-value
	Proportion	% (95% CI)	Proportion	% (95% CI)	
Detectable	62/63	98.4 (91.5–99.7)	59/63	93.7 (84.8–97.5)	0.365
Quantifiable ≥ 10 IU/mL	61/61	100 (94.1–100)	59/61	96.7 (88.8–99.1)	0.476
Quantifiable ≥ 1000 IU/mL ^a	60/60	100 (94.0–100)	59/60	98.3 (91.1–99.7)	1.000
Quantifiable ≥ 3000 IU/mL ^b	59/59	100 (93.4–99.1)	58/59	98.3 (91.0–99.7)	1.000

CI, Confidence Interval; DBS, Dried Blood Spot; IU, International Units; RNA-PoCT, Xpert HCV VL Fingerstick assay.

^a In specific settings, a qualitative HCV-RNA assay with a lower limit of detection ≤ 1000 IU/mL can be used to provide broad affordable access to HCV diagnosis and care (European Association for the Study of the Liver, 2018).

^b An HCV-RNA assay with a limit of detection of 3000 IU/mL or lower would be acceptable and identify 95% of those with viremic infection (World Health Organization, 2018).

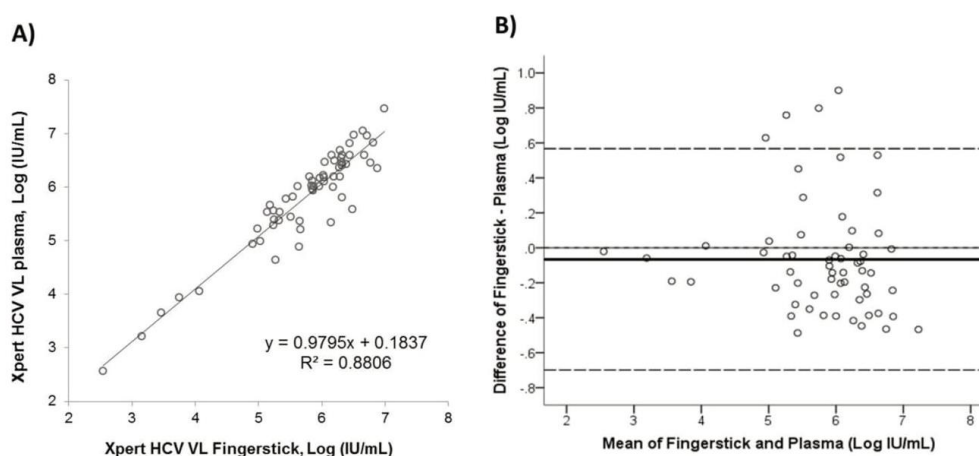


Fig. 2. Agreement of quantitative results between the Xpert FS and Xpert VL assays. A) Correlation between viral loads. B) Bland-Altman bias plot of differences of the Xpert FS minus Xpert VL viral loads in participants with quantifiable results by both assays ($n = 60$). The black line represents the existing bias of -0.0659 Log (IU/mL) in viral loads of the Xpert FS in comparison with the Xpert VL assay; dashed lines represent the 95% limits of agreement of -0.69898 to 0.56718 .

The mean viral load of the 60 participants with quantified results by both the reference method and the Xpert FS assay was 5.82 Log(IU/mL) [range 2.56 – 7.46 Log(IU/mL)] and 5.75 Log(IU/mL) [range, 2.54 – 6.99 Log(IU/mL)], respectively. The correlation between viral load results obtained by both methods was significant (Spearman's Rho, $\rho = 0.87$), as shown in Fig. 2A. The Bland-Altman plot (Fig. 2B) showed a bias of -0.0659 Log (IU/mL) of the Xpert FS assay compared to the reference method, with 95% limits of agreement of -0.69898 to 0.56718 , indicating slightly lower viral loads with the fingerstick than with the plasma-based assay. Four samples were over the upper limit of agreement, with a higher viral load by the Xpert FS assay than with the reference method.

For 12 participants an error was obtained while the Xpert FS assay was running and required a repeat test: (i) for nine participants the assay aborted once, while for one participant it aborted three times due to volume errors; (ii) in one case, an invalid result was obtained due to the cycle threshold of the controls being too high and no incidents were observed in the repeat test; and (iii) in another case an invalid result was obtained due to the failure of controls, but the result was manually validated as qualitatively positive (not quantifiable) following technical service's recommendations. Overall, a total of 113 cartridges were required to generate valid results for the 100 participants (11.5% of the cartridges failed). Regarding volume errors, no obvious trend was observed over time (1/31 participants in the first, 8/36 in the second and 2/33 in the third study quarters) or among the four people performing the test. In addition to remote validation of tests results from the

laboratory in the present study, laboratory staff also acted as intermediaries between the DCR staff and technical support experts in some instances regarding trouble-shooting with the GeneXpert® System (software or barcode reader) helping to solve sporadic incidents in real time.

DBS-based assay

All DBS samples were rated as adequate for HCV-RNA testing as spots showed good quality (no change in the humidity indicator) and quantity (diameter and number of the spots) in all cases. As results were not delivered to participants, samples were stored at room temperature for a mean of 18.2 days (standard deviation, 9.5 days) before being processed in batches. For two participants (2.0%), an invalid result in DBS testing was obtained, which was resolved after re-testing.

The concordance between the DBS-based assay and the Xpert VL assay in plasma as the reference method was very good (Kappa = 0.916). Specificity was 100% (95% CI, 90.1%–100%), as no false positive result was obtained in comparison with the reference method, and sensitivity was 93.7% (95% CI, 84.8–97.5) (Table 2). The sensitivity was also assessed using the same three additional viral load thresholds as for the Xpert FS assay (Table 3). Sensitivity was 96.7% for the ≥ 10 IU/mL threshold, and 98.3% for both the ≥ 1000 and the ≥ 3000 IU/mL thresholds.

When the sensitivity of the DBS assay was compared with the sensitivity of the Xpert FS assay at each viral load threshold, using the Xpert VL assay as the reference method in both cases, the differences were not statistically significant (Table 3).

Influence of the HCV genotype and HIV infection on HCV-RNA detection

HCV could not be genotyped in the two participants with viral loads <10 IU/mL in plasma (2/63, 3.2%). In the remaining cases, the HCV genotype and subtype were assigned by sequencing, except for one case that failed and was tested with the Abbott HCV Genotype II assay (viral load, 1650 IU/mL). The HCV genotypes and subtypes identified were as follows: 3a ($n = 31$; 50.8%), 1a ($n = 24$; 39.3%), 1b ($n = 2$; 3.3%), 4a ($n = 2$; 3.3%), and 4d ($n = 2$; 3.3%). As false negative results with the Xpert FS assay were obtained only in one case, which was one of those two participants with a viral load <10 IU/mL, no effect of the HCV genotype/subtype on Xpert FS assay sensitivity could be identified. These two participants with viral loads <10 IU/mL in plasma were also false negative by the DBS assay. The remaining two false negative cases obtained by the DBS assay were classified as subtype 3a, but in both cases a rather low viral load was present (364 and 4530 IU/mL in plasma, respectively), while all other samples with subtype 3a were correctly detected (viral loads, $1650\text{--}2.9 \times 10^7$ IU/mL).

Similarly, no effect of HIV co-infection could be observed on the qualitative results of both the Xpert FS and the DBS assays. The prevalence of HIV infection was similar in the HCV-RNA positive and negative groups: 25.8% (16/62) vs. 29.0% (11/38) for the Xpert FS assay, $p = 0.911$; and 25.0% (15/60) vs. 30.0% (12/40) for the DBS-based assay, $p = 0.583$.

Delivery of HCV-RNA results and preferences in this regard

Provisional Xpert FS assay results were delivered to all 100 participants, and on the same day of testing in 80.0% of the cases. Among the 20 cases in which results were delivered on a different day, delivery took place between 1 and 8 days later (median, 3 days) when they came back to the DCR. Among the 11 participants that required repeated testing, eight out of 11 (72.7%) received the Xpert FS result on the same day of testing vs. 72 out of 89 (80.9%) that received the result in a different day ($p = 0.765$). Confirmed results (reference method) were available on the next working day and delivered to all 100 participants at a second visit to the DCR between 1 and 84 days (median, 7 days; interquartile range, 5–11 days). Referral to care was then initiated for all those who required treatment and were not already linked to care (62/63 viremic cases, 98.4%).

When participants were asked about their preferences (Fig. 3), 50.0% of the participants preferred to receive the result on the same day even if they had to wait for an hour; 13.0% preferred to receive results another day when coming back to the DCR; and 37.0% did not express a preference. When awareness of HCV status (either viremic or not) was taken into account, same-day delivery of results was preferred by 59.4% of those unaware and by 33.3% of those aware of their status,

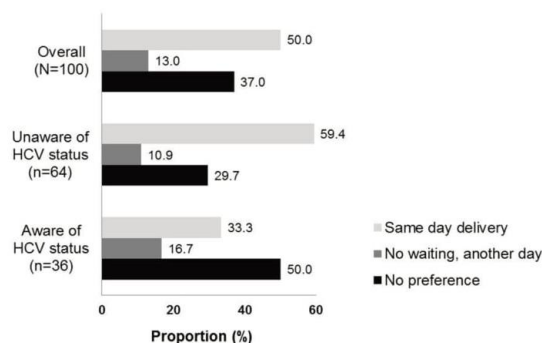


Fig. 3. Participants' preferences on receiving HCV-RNA testing results. Preferences were significantly different ($p = 0.041$) according to awareness of HCV status, either viremic or not.

($p = 0.012$). When considering only viremic participants, these proportions were 58.8% vs. 34.5%, respectively ($p = 0.054$).

Discussion

This study demonstrates that both the use of the Xpert FS PoCT or the HCV-RNA assay from on-site collected DBS samples are highly reliable tools for the simplified diagnosis of viremic HCV infection among current PWID. Furthermore, these could greatly improve the diagnosis strategy currently used at the HRS network in Catalonia (Ab-PoCT followed by referral to care of seropositive individuals for diagnosis confirmation in venous blood).

The Xpert FS assay showed an excellent real-world clinical performance for HCV-RNA detection (98.4% sensitivity and 100% specificity) among the population of current PWID attending a DCR in Barcelona. These results align with a previous field-based evaluation of this assay among individuals attending homeless and drug health services in Australia (one third of whom had a history of drug injection) (Lamoury et al., 2018), showing 98.3% sensitivity and 100% specificity for HCV-RNA detection when compared with the Abbott HCV RealTime assay (LOD of 12 IU/mL in comparison with 4 IU/mL for the Xpert VL assay used in our study). In both studies, the only discrepant result obtained for detectable results was below the LoQ of plasma assays and, thus, not likely to be clinically meaningful as most HCV-infected individuals have viral loads over 2 Log(IU/mL) at diagnosis (Alonso, Pérez-García, Ampuero, Reigadas & Bouza, 2017; Gupta, Agarwala, Kumar, Maiwall & Sarin, 2017). Also in line with Lamoury et al., the difference between HCV-RNA viral loads detected by the Xpert FS and the gold standard viral load method were minimal in both studies (-0.07 Log(IU/mL)). In another field evaluation in people with a history of injecting drug use attending an opioid agonist therapy clinic in Tanzania (Mohamed et al., 2019), sensitivity and specificity were 99.1% (one false negative with 6.2 Log IU/mL) and 98.7% (one false positive with 5.7 Log IU/mL), respectively, and a mean difference of 0.13 IU/mL in comparison with the Xpert VL assay.

Additionally, 19.5% (43/220) of participants required re-testing in the latter study (Mohamed et al., 2019), mostly due to volume errors. It is also important to bear in mind that capillary blood was collected and loaded into the cartridge by the clinic personnel, but cartridges were then transported (10-minute walking distance with high temperature and humidity conditions) to the central laboratory for testing by laboratory personnel. In the present study, 12% of participants required repeat testing. While no specific factor was identified as being associated with the Xpert FS test errors observed, they might have been due to several reasons, including: i) that the tests were performed by four different people belonging to the DCR staff with no previous laboratory experience (error rates were 8.1% or 2.8% in Australian studies where one trained operator performed the tests (Grebely et al., 2020; Lamoury et al., 2018)); ii) the presence of highly dense blood in some individuals (possibly due to dehydration in PWID); and iii) the use of research-use-only cartridges (Lamoury et al., 2018; Mohamed et al., 2019). When healthcare workers without expertise in laboratory tasks are involved in testing, they should be optimally trained to ensure the quality of the process (Grebely et al., 2017), and the presence of support from a reference laboratory is also advised to help them solve incidents in real time.

Similarly to the study by Mohamed et al. (2019), the present results were obtained in a setting with a higher HCV-RNA prevalence (60.6 and 63.0%) in comparison to the Australian study (40.5%) (Lamoury et al., 2018), and the presence of HCV/HIV co-infection (36.2% and 25.4%), which was not reported in the Australian study. No effect of HIV co-infection was observed on the qualitative results of the Xpert FS assay in the present study. Additionally, the HCV genotypes most commonly circulating among PWID in Spain are represented herein (genotyping data was partial in the Tanzanian study and lacking in the Australian study), and Xpert FS testing performed by the nursing personnel of the

DCR (laboratory personnel performed the whole Xpert FS testing procedure in the Australian study and operated the GeneXpert in the Tanzanian study), which highlights the major strength of this study: performance of the whole Xpert FS testing procedure in a real-world setting.

This is the first study to compare the clinical performance of the Xpert FS assay with a DBS-based assay for HCV-RNA detection. Given the reduced analytical sensitivity of the in-house DBS-based assay (LoD, 541 IU/mL of whole blood) in comparison to the Xpert FS assay (LoD, 35 IU/mL), 3/62 viremic cases were missed by the first assay in comparison with the second one (viral loads in fingerstick blood: positive < 100 IU/mL, 347 and 2920 IU/mL). However, when compared to the reference method in plasma, the difference between the clinical sensitivity of the DBS and the Xpert FS assays was not statistically significant for any of the four viral load thresholds assessed (detectable, quantifiable ≥ 10 IU/mL, quantifiable ≥ 1000 IU/mL and quantifiable ≥ 3000 IU/mL). Additionally, when either the quantifiable ≥ 1000 or ≥ 3000 IU/mL thresholds were used, as recommended by EASL (European Association for the Study of the Liver, 2018) and WHO guidelines (World Health Organization, 2018), respectively, for those assays improving access to and affordability of HCV diagnostics, only one viremic participant was missed by the DBS assay in comparison with the Xpert FS assay. Furthermore, no effect on the sensitivity of the DBS assay due to the HCV genotype or the HIV co-infection was observed in this study in agreement with our previous results (Saludes et al., 2019a). These results add to previous evidence showing a high diagnostic accuracy of the HCV-RNA detection assays in DBS samples (Lange et al., 2017; Vázquez-Morón et al., 2019), especially with viral loads above 1000 IU/mL (Catlett et al., 2019; Saludes et al., 2019a; Shepherd, Baxter & Gunson, 2019).

Unlike DBS-based testing, the Xpert FS assay is an instrumented PoCT assay that facilitates same-day diagnosis of viremic infection. Nevertheless, the rate and time to delivery of the Xpert FS assay results have not been previously evaluated. Results in this study were delivered to 100% of the participants and on the same day of testing in 80.0%. Test repeating due to errors had no statistically significant influence on same day delivery of results in comparison with no repeating. While waiting for their results, some of the participants consumed drugs in the DCR while others spent time in the center's coffee room where basic food was available. Interestingly, when the preferences of PWID were taken into account, 50.0% of them preferred same-day delivery of HCV-RNA testing results, indicating that this was not a priority for many participants. This proportion is somewhat lower than that found by Bajis et al. (63%) (Bajis et al., 2018). Contrary to common belief, getting their results on the next visit at the HRS might not be a barrier for PWID that are regular users of these services. While DBS results were not delivered to participants in this study, delivery of confirmatory test results at a return visit was feasible for 100% of the participants. However, this proportion may vary depending on the time to result in different settings and the use of incentives. Economic incentivization has been shown to improve linkage to care and treatment among PWID (Norton et al., 2019; Ward et al., 2019). Even if DBS results would have to be delivered upon a second visit, the DBS-based strategy would still avoid the need to have several appointments at mainstream healthcare centers for everything from phlebotomy to the delivery of test results. Given the associated costs with HCV-RNA PoCT in Spain, and considering the simplicity of DBS collection, storage and transportation to centralized laboratories, DBS testing could be a useful and reliable alternative for the identification of viremic individuals at HRS where the Xpert FS testing is neither affordable nor feasible. This may be due to space requirements, power supply, Internet connectivity for remote validation of results, and the availability of personnel who are able to perform testing.

As previously suggested, since no single testing strategy is likely to reach all people affected, different screening strategies could be used depending on the setting, targeted population, model of care, and

relative costs (Chevaliez, 2019; Lazarus et al., 2019a). In line with our results, the Spanish Society for the Study of the Liver has recently expressed that in order to reach hepatitis C elimination in Spain, decentralized diagnosis (which includes the use of a DBS-based testing or an HCV-RNA PoCT) should be promoted in marginalized populations that seldom attend mainstream healthcare services, such as PWID (Crespo et al., 2019). This will also contribute to reducing late presentation to care (Lazarus et al., 2019b).

Thus, both RNA-PoCT and DBS strategies would potentially reduce the number of individuals lost to follow-up during the diagnostic process and, consequently, increase the number of HCV-infected PWID that are aware of their status and that can be linked to care. As a result of the present intervention, 54.8% of the viremic participants became aware of their status, and 98.4% of viremic cases that were not previously linked to care were referred to care. However, the assessment of effective linkage to care by following up participants was beyond the scope of this study. Future studies should demonstrate if on-site screening at HRS (either by RNA-PoCT or DBS) increases linkage to care among this population. In this regard, efforts are being made to shorten the time to obtain the HCV-RNA result by the Xpert FS assay (Grebely et al., 2020), but the idea that a more rapid time to diagnosis will enhance linkage to treatment must be demonstrated. Additionally, the need for remote validation of Xpert FS assay results from a central laboratory may be a limitation in this respect when trained laboratory staff is not involved in the actual testing.

International guidelines have suggested that direct testing for HCV-RNA and near-patient testing could be considered to replace screening based on anti-HCV antibody testing if the screening strategy is cost-effective (European Association for the Study of the Liver, 2018). In line with this, Scott et al. (2017) demonstrated that replacing the use of the Ab-PoCT by an RNA-PoCT increased healthcare cost-savings and increased incidence reduction among PWID in Australia in comparison with other scenarios. The high HCV seroprevalence observed in the study population (89.0%) evidences that referring all seropositive cases to care presents a high workload for DCR personnel with the current strategy in Catalonia. Direct screening for HCV-RNA would allow DCR personnel to focus on referral to care only for those PWID who are in need of antiviral treatment (63.0% HCV-RNA prevalence). This is especially important as the number of cured PWID carrying HCV antibodies will increase with the wider use of HCV antiviral therapies (Grebely et al., 2019; Iversen et al., 2019). Nevertheless, local cost-effectiveness studies should be performed to establish whether the HCV-RNA PoCT or the DBS-based assay could either replace the Ab-PoCT test usually offered in the Catalan HRS settings (one-step strategy) or complement it as a reflex test following a positive Ab-PoCT (two-step strategy). These studies should take into account the number of viremic cases with undetectable antibody levels by the Ab-PoCT that may be missed by a two-step strategy either due to acute infection or negative results of the Ab-PoCT (3.2% in this study as detected both by the RNA-PoCT and DBS assays, and 4.1% in our previous study in HRS) (Saludes et al., 2019a).

This study has several limitations. Firstly, the clinical performance of the Xpert FS and DBS-based tests and delivery of results observed in this study may not be generalizable to other settings. It should be considered that this study was performed in PWID engaged in harm reduction by directly testing for HCV-RNA (one-step diagnosis strategy) in a population with a high prevalence of viremic HCV infection (63.0%), including HCV genotypes commonly circulating among PWID in Spain (that is, genotypes 5 and 6 were not represented), and using economic incentives. Secondly, the linkage to care of participants after receiving HCV-RNA test results was not assessed. In a previous study in the same DCR assessing linkage to care after 6 months of receiving the results, 46.9% attended primary or specialist care but none started treatment (Saludes et al., 2018b). Since the last quarter of 2018, a pilot HCV micro-elimination study is ongoing at the DCR participating in this study, with on-site testing (using the Xpert FS assay) and treatment, as

well as monitoring for reinfection (using DBS samples) (Lens et al., 2020). Further studies should evaluate the rate of same-day delivery of Xpert FS results and linkage to care after Xpert or DBS testing in different situations as well as their cost-effectiveness.

In conclusion, the one-step HCV-RNA PoCT diagnosis strategy evaluated at the DCR increased PWID awareness of their HCV status and allowed for the timely and reliable identification of potential treatment candidates. Given its high accuracy and that it was a PoCT, the use of the Xpert FS assay could facilitate the implementation of decentralized HCV test-and-treat micro-elimination strategies in PWID attending HRS, including decentralized diagnosis (on-site HCV-RNA testing and delivery of test results), followed by non-invasive fibrosis assessment, and treatment supervision (treatment administration, adherence support, and evaluation of treatment outcome and reinfection). Additionally, in centers where the use of the RNA-PoCT is not feasible, DBS testing could be an alternative. Regardless of whether the RNA-PoCT or the DBS-based testing is performed, quality assurance programs should be established (Grebely et al., 2017; Saludes et al., 2019a). Obtained data will be critical for guiding efforts towards HCV elimination among PWID in the context of the Plan for the Prevention and Control of Hepatitis C in Catalonia (Comissió per a l'elaboració del pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya, 2018) and will be instrumental in achieving WHO's elimination targets.

CRedit authorship contribution statement

V. Saludes: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **A. Antuori:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **J.V. Lazarus:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **C. Folch:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **S. González-Gómez:** Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **N. González:** Resources, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **N. Ibáñez:** Visualization, Writing - review & editing. **J. Colom:** Visualization, Writing - review & editing. **L. Matas:** Resources, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **J. Casabona:** Visualization, Writing - review & editing. **E. Marró:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Interest

VS: travel sponsorship to attend scientific meetings from Gilead Sciences and Cepheid. JVL: speaking and grant support from Gilead Sciences; advisory committee and grant support from AbbVie; speaking and grant support from MSD; advisory committee of Janssen; speaking fee from Cepheid, outside the submitted work. EM: advisory board member, research grants, speaking fees as well as travel sponsorship for meetings from Gilead Sciences; research grants and travel sponsorship for presentation of results at meetings from Abbott GmbH & Co. K.G; speaking fees and grant support from Cepheid. The other authors have no competing interests to declare.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge and thank to the participants who have generously participated in this study. The authors also thank all the other professionals at HRS that have collaborated in this study: Dulce García, Vicente Cruz, Judit Rebollo, and Laura Quesada.

This study was partially funded by Cepheid Inc (CA, USA), but Cepheid had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This study was also funded by the Instituto de Salud Carlos III/FEDER, European Union

(grant number PI15/000284, 2016-2018). EM and JVL hold a Miguel Servet position for researchers in the Spanish National Health System (Instituto de Salud Carlos III/FSE, European Union, grant numbers CPII15/00028 (2016-2019) and CP18/00074 (2019-2022), respectively). The authors thank the CERCA Program/Generalitat de Catalunya for their support to the Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP) and the Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal). JVL further acknowledges support from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities through the "Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023" Programme (CEX2018-000806-S).

References

- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2018). *Sistema d'Informació sobre Drogodependències a Catalunya*. Generalitat de Catalunya. Informe anual 2017. Retrieved 1st October 2019 from http://drogues.gencat.cat/web/content/minisite/drogues/professionals/epidemiologia/docs/SIDC-Informe-2017-FINAL_181022.pdf.
- Alonso, R., Pérez-García, F., Ampuero, D., Reigadas, E., & Bouza, E. (2017). New direct-acting antivirals for patients with chronic HCV infection: Can we monitor treatment using an HCV core antigen assay? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3), 243-246. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.010>.
- Applegate, T. L., Fajardo, E., & Sacks, J. A. (2018). Hepatitis C virus Diagnosis and the Holy Grail. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(2), 425-445. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.02.010>.
- Bajis, S., Maher, L., Treloar, C., Hajarizadeh, B., Lamoury, F. M. J., Mowat, Y., ... Grebely, J. (2018). Acceptability and preferences of point-of-care finger-stick whole-blood and venepuncture hepatitis C virus testing among people who inject drugs in Australia. *The International Journal of Drug Policy*, 61, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2018.08.011>.
- Catlett, B., Carrera, A., Starr, M., Applegate, T. L., Lowe, P., Grebely, J., et al. (2019). Performance evaluation of the Hologic Aptima HCV Quant Dx assay for detection of HCV RNA from dried blood spots. *Journal of Clinical Virology*, 112, 40-44. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.01.010>.
- Cepheid. (2019). *Cepheid solutions. Xpert® HCV VL Fingerstick*. Retrieved 1st November 2019 from <https://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hcv-vl-fingerstick>.
- Cepheid. (2019). *Cepheid solutions. Xpert® HCV Viral Load*. Retrieved 1st November 2019 from <https://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hcv-viral-load>.
- Chevaliez, S. (2019). Strategies for the improvement of HCV testing and diagnosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(5), 341-347. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1604221>.
- Cooke, G. S., Andrieux-Meyer, I., Applegate, T. L., Atun, R., Burry, J. R., Cheinquer, H., ... Wiktor, S. Z. (2019). Accelerating the elimination of viral hepatitis: A Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(2), 135-184. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30270-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30270-X).
- Crespo, J., Alballos, A., Buti, M., Calleja, J. L., García-Samaniego, J., Hernández-Guerra, M., ... Sánchez Antolín, G. (2019). Eliminación de la hepatitis C. Documento de posicionamiento de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEHF). *Gastroenterología y Hepatología*, 42(9), 579-592. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2019.09.002>.
- Dean, A. G., Sullivan, K. M., & Soe, M. M. (2013). *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. Retrieved 15th February 2020 from www.OpenEpi.com.
- Douglass, C. H., Pedrana, A., Lazarus, J. V., 't Hoen, E. F. M., Hammad, R., Leite, R. B., ... Hellard, M. (2018). Pathways to ensure universal and affordable access to hepatitis C treatment. *BMC Medicine*, 16(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1162-z>.
- Harris, M., McDonald, B., & Rhodes, T. (2014). Hepatitis C testing for people who inject drugs in the United Kingdom: Why is uptake so low? *Drugs: Education, Prevention and Policy*, 21(4), 333-342.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2019). *Hepatitis C: New Models of Care for Drugs Services*. Lisbon: EMCDDA. Retrieved August 1st, 2019 from http://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/hepatitis-c-models-of-care_en#panel7.
- European Association for the Study of the Liver. (2018). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *Journal of Hepatology*, 69(2), 461-511 [Epub].
- Fernández-López, L., Folch, C., Majó, X., Gasulla, L., & Casabona, J. (2016). Implementation of rapid HIV and HCV testing within harm reduction programmes for people who inject drugs: A pilot study. *AIDS Care*, 28(6), 712-716. <https://doi.org/10.1080/09540121.2016.1164290>.
- Folch, C., Casabona, J., Espelt, A., Majó, X., Meroño, M., Gonzalez, V., ... Brugal, MT (2016). High prevalence and incidence of HIV and HCV among new injecting drug users with a large proportion of migrants—Is prevention failing? *Substance Use & Misuse*, 51(2), 250-260. <https://doi.org/10.3109/10826084.2015.1092991>.
- Grebely, J., Applegate, T. L., Cunningham, P., & Feld, J. J. (2017). Hepatitis C point-of-care diagnostics: In search of a single visit diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(12), 1109-1115. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1400385>.
- Grebely, J., Catlett, B., Jayasinghe, L., Valerio, H., Hajarizadeh, B., Verich, A., ... Applegate, T. L. (2020). Time to detection of hepatitis C infection with the Xpert HCV viral load Fingerstick point-of-care assay: Facilitating a more rapid time to diagnosis. *Journal of Infectious Diseases*, jiaa037. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa037>.
- Grebely, J., Lamoury, F. M. J., Hajarizadeh, B., Mowat, Y., Marshall, A. D., Bajis, S., ...

- Applegate, T. L. (2017). Evaluation of the Xpert HCV viral load point-of-care assay from venepuncture-collected and finger-stick capillary whole-blood samples: A cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2(7), 514–520. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30075-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30075-4).
- Grebeley, J., Larney, S., Peacock, A., Colledge, S., Leung, J., Hickman, M., ... Degenhardt, L. (2019). Global, regional, and country-level estimates of hepatitis C infection among people who have recently injected drugs. *Addiction (Abingdon, England)*, 114(1), 150–166. <https://doi.org/10.1111/add.14393>.
- Gupta, E., Agarwala, P., Kumar, G., Maiwall, R., & Sarin, S. K. (2017). Point-of-care testing (POCT) in molecular diagnostics: Performance evaluation of Genexpert HCV RNA test in diagnosing and monitoring of HCV infection. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 88, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.01.006>.
- Iversen, J., Dore, G. J., Catlett, B., Cunningham, P., Grebeley, J., & Maher, L. (2019). Association between rapid utilisation of direct hepatitis C antivirals and decline in the prevalence of viremia among people who inject drugs in Australia. *Journal of Hepatology*, 70(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.030>.
- Lamoury, F. M. J., Bajis, S., Hajrizadeh, B., Marshall, A. D., Martinello, M., Ivanova, E., ... Grebeley, J. (2018). Evaluation of the Xpert HCV viral load finger-stick point-of-care assay. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(12), 1889–1896. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy114>.
- Lange, B., Roberts, T., Cohn, J., Greenman, J., Camp, J., Ishizaki, A., ... Easterbrook, P. (2017). Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples – A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 17(51), 693. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2776-z>.
- Lazarus, J. V., Perić, J. M., Picchio, C., Cernosa, J., Hoekstra, M., Luhmann, N., ... Dillon, J. F. (2019a). We know DAA s work, so now what? Simplifying models of care to enhance the hepatitis C cascade. *Journal of Internal Medicine*, 286(5), 503–525. <https://doi.org/10.1111/joim.12972>.
- Lazarus, J., Safreed-Harmon, K., Thurst, M., Dillon, J., El-Sayed, M., Elsharkawy, A., ... Colombo, M. (2018). The micro-elimination approach to eliminating hepatitis C: Strategic and operational considerations. *Seminars in Liver Disease*, 38(3), 181–192. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1666841>.
- Lazarus, J. V., Picchio, C., Dillon, J. F., Rockstroh, J. K., Weis, N., & Buti, M. (2019b). Too many people with viral hepatitis are diagnosed late - with dire consequences. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(8), 451–452. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0177-z>.
- Lens, S., Miralpeix, A., Gálvez, M., Martró, E., González, N., Rodríguez-Tajes, S., et al. (2020). Poster 130. Decentralized model of screening and access to hepatitis C treatment in the largest harm reduction center in Barcelona. *45th Annual Congress of the Spanish Association for the Study of the Liver February 12–14*.
- Llibre, A., Shimakawa, Y., Mottez, E., Ainsworth, S., Buivan, T.-P., Firth, R., ... Duffy, D. (2018). Development and clinical validation of the Genedrive point-of-care test for qualitative detection of hepatitis C virus. *Gut*, 67(11), 2017–2024. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315783>.
- Martró, E., González, V., Buckton, A. J., Saludes, V., Fernández, G., Matas, L., ... Ausina, V. (2008). Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 192–197. <https://doi.org/10.1128/JCM.01623-07>.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L., & Simmonds, P. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: Implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *The Journal of General Virology*, 76(10), 2493–2507. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-10-2493>.
- Mohamed, Z., Mbwambo, J., Rwegasha, J., Mgina, N., Doulla, B., Mwakale, P., ... Lemoine, M. (2019). In-field evaluation of Xpert® HCV viral load Fingerstick assay in people who inject drugs in Tanzania. *Liver International*, 40(3), 514–521. <https://doi.org/10.1111/liv.14315>.
- Norton, B. L., Bachhuber, M. A., Singh, R., Agyemang, L., Arnsten, J. H., Cunningham, C. O., et al. (2019). Evaluation of contingency management as a strategy to improve HCV linkage to care and treatment in persons attending needle and syringe programs: A pilot study. *International Journal of Drug Policy*, 69, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2019.02.009>.
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2018). *Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC)*. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Retrieved from [http://www.msbs.gob.es/ciudadanos/en/lesiones/en/transmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/docs/PlanEstrategico_Abordaje_Hepatitis_C_\(PEAHC\).pdf](http://www.msbs.gob.es/ciudadanos/en/lesiones/en/transmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/docs/PlanEstrategico_Abordaje_Hepatitis_C_(PEAHC).pdf).
- Saludes, V., Antuori, A., Folch, C., González, N., Ibáñez, N., Majó, X., ... Martró, E. (2019a). Utility of a one-step screening and diagnosis strategy for viremic HCV infection among people who inject drugs in Catalonia. *International Journal of Drug Policy*, 74, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2019.10.012>.
- Saludes, V., Antuori, A., Reinhardt, B., Viciana, I., Clavijo, E., Schreiber, L., ... Martró, E. (2019b). Reliable resolution of ambiguous hepatitis C virus genotype 1 results with the Abbott HCV Genotype Plus RUO assay. *Scientific Reports*, 9(1), 3678. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40099-3>.
- Saludes, V., Folch, C., Antuori, A., González, N., García, D., Anoro, M., et al. (2018b). Universal on-site HCV RNA screening is warranted among PWID who attend harm reduction centres in Catalonia, Spain. *7th International Symposium on Hepatitis Care in Substance Users (INHSU) 19 - 21 September 2018*.
- Saludes, V., Folch, C., Morales-Carmona, A., Ferrer, I., Fernández-López, L., Muñoz, R., ... Martró, E. (2018a). Community-based screening of hepatitis C with a one-step RNA detection algorithm from dried-blood spots: Analysis of key populations in Barcelona, Spain. *Journal of Viral Hepatitis*, 25(3), 236–244. <https://doi.org/10.1111/jvh.12809>.
- Schroeder, S. E., Pedrana, A., Scott, N., Wilson, D., Kuschel, C., Aufegger, L., ... Howell, J. (2019). Innovative strategies for the elimination of viral hepatitis at a national level: A country case series. *Liver International*, 39(10), 1818–1836. <https://doi.org/10.1111/liv.14222>.
- Scott, N., Doyle, J. S., Wilson, D. P., Wade, A., Howell, J., Pedrana, A., ... Hellard, M. E. (2017). Reaching hepatitis C virus elimination targets requires health system interventions to enhance the care cascade. *International Journal of Drug Policy*, 47, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2017.07.006>.
- Comissió per a l'elaboració del pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya. (2018). *Pla de prevenció i control de l'hepatitis C a Catalunya*. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Retrieved from http://salutpublica.gencat.cat/web/contenut/minisite/aspacat/vigilancia_salut_publica/vih-sida-its/04_Hepatitis_viriques/Pla-Hepatitis-Definitiu_C_DEF.pdf.
- Shepherd, S. J., Baxter, R. E., & Gunson, R. N. (2019). Evaluation of the Abbott m2000 system for dried blood spot detection of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Virology*, 110, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.008>.
- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2019). *Sistema d'Informació sobre Drogodependències de Catalunya*. Generalitat de Catalunya. Informe anual 2018. Retrieved 4th October 2019 from http://drogues.gencat.cat/web/contenut/minisite/drogues/professionals/epidemiologia/docs/Informe_2018_SIDC_ok.pdf.
- Vázquez-Morón, S., Ardizzone Jiménez, B., Jiménez-Sousa, M. A., Bellón, J. M., Ryan, P., & Resino, S. (2019). Evaluation of the diagnostic accuracy of laboratory-based screening for hepatitis C in dried blood spot samples: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 7316. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41139-8>.
- Ward, K. M., Falade-Nwulia, O., Moon, J., Sutcliffe, C. G., Brinkley, S., Haselhuhn, T., ... Sulkowski, M. S. (2019). A Randomized controlled trial of cash incentives or peer support to increase HCV treatment for persons with HIV who use drugs: The champs study. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(4), ofz166. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz166>.
- World Health Organization. (2016). *Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>.
- World Health Organization. (2018). *Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection*. Geneva: World Health Organization. Retrieved 1st August 2019 from <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2018/en/>.

250



Artículos

Artículo III



Characterization of Acute HCV Infection and Transmission Networks in People Who Currently Inject Drugs in Catalonia: Usefulness of Dried Blood Spots

Adrián Antuori ^{1,2}, Vincent Montoya,³ David Piñeyro ⁴, Lauro Sumoy,⁴ Jeffrey Joy,^{3,5} Mel Krajden,⁶ Sara González-Gómez,¹ Cinta Folch,^{7,8} Jordi Casabona,^{7,8} Lurdes Matas,^{1,2,8} Joan Colom,⁹ Veronica Saludes ^{1,2,8*} and Elisa Martró ^{1,2,8*},
 HepCdetect II Study Group

BACKGROUND AND AIMS: Accurate identification of recent HCV infections is critical for tracing the extent and mechanisms of ongoing transmission. We aimed to validate dried blood spot (DBS) samples for the assessment of HCV genetic diversity and to determine epidemiological parameters including incidence, determinants of acute infection, and phylogenetic clustering in people who inject drugs (PWID).

APPROACH AND RESULTS: HCV nonstructural protein 5B next-generation sequencing was performed from plasma and/or DBS in 220 viremic PWID from the HepCdetect II study. No significant differences were found in consensus sequences or Shannon entropy (SE) intrahost diversity estimate between paired plasma/DBS specimens. SE values were used to identify acute infections with 93.3% sensitivity (95% CI, 0.81–1.06) and 95.0% specificity (95% CI, 0.88–1.02) in a set of well-defined controls. An acute HCV infection (either primary infection or reinfection) was detected in 13.5% of viremic participants and was associated with age ≤ 30 years (OR, 8.09), injecting less than daily (OR, 4.35), ≤ 5 years of injected drug use (OR, 3.43), sharing cocaine snorting straws (OR, 2.89), and being unaware of their HCV status (OR, 3.62). Annualized HCV incidence was estimated between 31 and 59/100 person-years. On phylogenetic analysis,

46.8% of viremic cases were part of a transmission pair or cluster; age ≤ 30 years (OR, 6.16), acute infection (OR, 5.73), and infection with subtype 1a (OR, 4.78) were independently associated with this condition.

CONCLUSIONS: The results obtained from plasma and DBS characterize PWID with acute infection and those involved in ongoing HCV transmission and allow estimating incidence from cross-sectional data. This information is critical for the design and assessment of targeted harm reduction programs and test-and-treat interventions and to facilitate monitoring of HCV elimination in this key population. (HEPATOLOGY 2021;0:1–16).

People who inject drugs (PWID) have historically been at the core of the hepatitis C epidemic. It was estimated that 39.2% of PWID were infected by HCV, representing 8.5% of all infections worldwide in 2015.⁽¹⁾ Furthermore, i.v. drug use remains the main route of HCV transmission among the newly reported cases in Europe (44.0%).⁽²⁾ Despite the fact that testing and antiviral treatment

Abbreviations: AUROC, area under the ROC curve; DBS, dried blood spot; HRS, harm reduction services; IQR, interquartile range; NGS, next-generation sequencing; NSSB, nonstructural protein 5B; PWID, people who inject drugs; ROC, receiver operating characteristic; SE, Shannon entropy; WHO, World Health Organization.

Received June 15, 2020; accepted January 20, 2021.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31757/supinfo.

*These authors are co-senior authors on this work.

The HepCdetect II Study was partly funded by the competitive Fellowship Program from Gilead Spain (GLD16-00135, 2017–2018), but Gilead had no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to publish. This study was also funded by the Instituto de Salud Carlos III/FEDER, European Union (PI15/000284, 2016–2018). E.M. held a Miguel Servet position for researchers in the Spanish National Health System (Instituto de Salud Carlos III/FSE, European Union, CPII15/00028, 2016–2019).

The CERCA Programme/Generalitat de Catalunya provided support to the Germans Trias i Pujol Research Institute.

© 2021 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.31757

ANTUORI ET AL.

HEPATOLOGY, Month 2021

are cost-effective⁽³⁾ and have been prioritized in PWID by international guidelines,^(4,5) diagnosis and treatment rates are still low in this population.⁽⁶⁾

The World Health Organization (WHO) has included reaching 90% diagnosis and 80% treatment rates in the main targets to eliminate HCV infection as a major public health threat by 2030.⁽⁷⁾ To reach these goals, the WHO strategy highlights the use of innovative screening approaches to enhance access to HCV testing and treatment.⁽⁸⁾ Minimally invasive dried blood spot (DBS) sampling has been shown to be a useful tool for increasing access to HCV testing and linkage to care among PWID,⁽⁹⁾ as well as a suitable sample type to determine HCV genotyping by phylogenetic analysis.⁽¹⁰⁾

Additionally, the use of DBS has been recommended by the WHO⁽⁸⁾ due to several factors: firstly, it is easy to collect and stable at room temperature for storage and transportation to the laboratory; secondly, molecular assays have high sensitivity and specificity for the detection of HCV RNA from these minimally invasive samples⁽¹¹⁾; and thirdly, its high acceptability by PWID as venipuncture can be difficult because of poor vein accessibility. In high HCV prevalence populations, such as PWID, DBS testing also allows the identification of viremic HCV individuals by directly detecting the HCV RNA, avoiding previous antibody screening (one-step strategy). This strategy permits

identification of viremic individuals with undetectable antibody levels (i.e., acute infection within the antibody window period or suboptimal serological response) and exclusion of those with a resolved infection.^(12,13)

Identification of specific risk factors involved in HCV transmission, especially among those individuals who have been infected recently and are driving HCV transmission, is crucial to design specifically targeted preventive measures.⁽¹⁴⁾ Acute infection is defined as the period comprising the first 6 months following infection acquisition.⁽¹⁵⁾ However, its identification is challenging due to absent or unspecific symptoms in most cases and the limited value of available infection markers. Acute infection can only be reliably identified within the antibody window period (the first 6–8 weeks after exposure, when the HCV RNA is detected in seronegative patients) or when seroconversion is observed in longitudinal studies. In this sense, Montoya et al. demonstrated that intra-host diversity of the HCV nonstructural protein 5B (NS5B) region assessed by next-generation sequencing (NGS) proportionally increases with the duration of the infection and has the potential of differentiating acute from chronic HCV infections at the population level even after seroconversion, thus serving as an alternative method to identify acute infections,⁽¹⁶⁾ being either primary infections or reinfections. This

Potential conflict of interest: Dr. Kraiden received grants from Hologic, Roche, and Siemens. Dr. Saludes received travel grants from Cepheid and Gilead. Dr. Martró advises, is on the speakers' bureau for, and received grants from Gilead. She is on the speakers' bureau for and received grants from Cepheid. She received grants from Abbott.

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ²Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ³BC Centre for Excellence in HIV, Vancouver, BC, Canada; ⁴High Content Genomics & Bioinformatics Unit, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Program of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Badalona, Spain; ⁵Department of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; ⁶Public Health Laboratory, Hepatitis—Clinical Prevention Services British Columbia Centre for Disease Control, Vancouver, BC, Canada; ⁷Centre for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia, Public Health Agency of Catalonia, Badalona, Spain; ⁸Group 27, Biomedical Research Networking Centre in Epidemiology and Public Health, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁹Programme for Prevention, Control and Treatment of HIV, STIs and Viral Hepatitis, Public Health Agency of Catalonia, Barcelona, Spain.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Elisa Martró, Ph.D.
Microbiology Department
Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute (IGTP)

Crta. del Canyet s/n 08916
Badalona, Spain
E-mail: emartro@igtp.cat
Tel.: +34-934978894

method would be very useful to measure incidence in cross-sectional studies in order to monitor the HCV epidemic and focus elimination efforts. In addition, phylogenetic cluster analysis of HCV strains circulating among PWID is a powerful tool to understand population-level transmission dynamics by identifying recent transmission events.^(14,17,18) Furthermore, it allows inference of infecting networks⁽¹⁹⁾ and identification of groups of individuals at greatest risk of transmitting the infection.^(14,20)

The HepC*detect* II study was designed to facilitate access to diagnosis of viremic HCV infection in people who currently inject drugs and attend harm reduction services (HRS) in Catalonia and to characterize the local HCV epidemics in this key population. The use of a one-step diagnosis strategy based on the detection of HCV RNA in DBS samples proved to be feasible and reliable and provided us with an estimate of viremic HCV infection prevalence in this context (58.5%).⁽¹³⁾ The second purpose of the HepC*detect* II was to perform a molecular epidemiology study to further characterize the local HCV epidemic in our setting. With this aim, we defined two specific objectives: (1) to validate the use of DBS samples for the assessment of HCV genetic diversity both interhost (genotype/subtype) and intrahost and, based on this information, (2) to determine key HCV epidemiological parameters including incidence and determinants of acute infections and phylogenetic clustering.

Materials and Methods

STUDY DESIGN, DATA COLLECTION, AND SAMPLES

Briefly, HepC*detect* II was a community-based cross-sectional study in a convenience sample of current PWID (N = 410) ≥ 18 years old who had injected drugs over the previous 6 months. Recruitment took place at four HRS in Barcelona province (May 2016–July 2017) under written informed consent (study approved by the Ethics Committee at the Germans Trias i Pujol University Hospital, approved application number PI-18-246). Sociodemographic and behavioral data were collected using an anonymous questionnaire administered by trained staff at the participating HRS. DBS samples were collected by fingerstick from all study participants, and plasma was

additionally collected by venipuncture in 300 PWID who attended one of the participating HRS (the one that serves the largest number of users per year in Catalonia). Detailed information on the study and characteristics of participants have been described.⁽¹³⁾

For the purpose of the analyses shown herein, all viremic cases in the HepC*detect* II study were initially considered (N = 265). For those with both DBS and plasma samples available, plasma samples were used (n = 203), while DBS were used for those with no paired plasma available (n = 62). Additionally, in order to validate the usefulness of DBS samples for the characterization of the intrahost and interhost HCV genetic diversity, paired plasma/DBS specimens were used for 16 participants (Fig. 1). These samples were representative of the different HCV genotypes and subtypes, as well as the range of viral loads present in the study population.

NUCLEIC ACID EXTRACTION AND HCV RNA TESTING

DBS samples were shipped and stored at room temperature for a mean of 20.0 days (standard deviation, 11.0 days) before processing, according to established HCV RNA stability in those conditions.⁽²¹⁾ DBS were subjected to automated nucleic acid extraction and qualitative HCV RNA testing (lower limit of detection, 541 IU/mL of whole blood) as described.^(13,21) The remaining RNA as well as plasma samples were stored at -80°C. HCV viral loads were quantified from plasma by a commercial assay according to the manufacturer's instructions (Abbott, Chicago, IL; lower limit of detection, 12 IU/mL).

AMPLIFICATION AND NGS OF THE NS5B REGION

According to preliminary experiments (data not shown), plasma samples with a viral load >10,000 IU/mL (n = 203; median viral load, 5.84 log₁₀[IU/mL]; range, 4.03–7.37 log₁₀[IU/mL]) were subjected to this procedure. Regarding DBS, all available samples with no paired plasma were processed as PCR used for HCV RNA detection from DBS is not quantitative.⁽²⁰⁾ From frozen extracted nucleic acids, reverse transcription and PCR were performed as described in Supporting Text 1 over the recruitment period. HCV-specific pangenotypic PCR primers⁽²²⁾ with

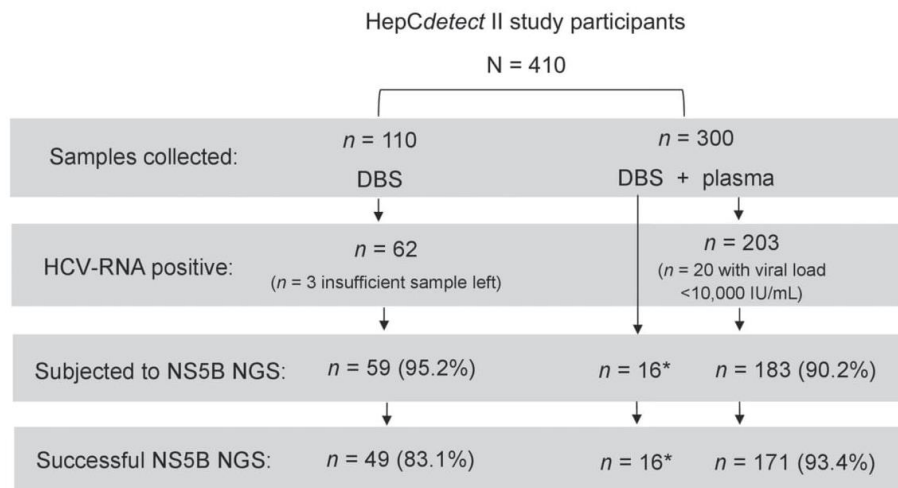


FIG. 1. Flowchart of plasma and DBS sample processing. *Samples used for the comparison between plasma/DBS pairs.

Illumina-compatible overhangs were used to amplify a 389-bp fragment of the HCV NS5B region (nucleotide positions 8250-8638 of the HCV H77 reference genome). NS5B amplicons were purified and size-selected using Agencourt Ampure XP beads (Beckman-Coulter, Brea, CA), following the manufacturer's protocol, and stored at -20°C until library preparation. Dual indexed libraries were obtained with the Nextera Index Kit v2 (Illumina, San Diego, CA) with eight PCR cycles, following the manufacturer's protocol. Libraries were purified, pooled, and subjected to paired-end sequencing (2×250 bp) in six runs with the MiSeq platform (Illumina). Library quality was assessed using the TapeStation system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). An NS5B plasmid control sample was run in parallel with the study samples in each NGS run to quantify potential errors introduced during the sequencing process, as described.⁽¹⁶⁾

HCV GENOTYPING

In order to assess interhost HCV genetic diversity (genotype and subtype) from NGS data, a bioinformatic tool was developed (HCVGenoTool, available at github; <https://github.com/igtp-genbioinfo/HCVgenotool>) (Supporting Text 2). "Mixed infections" were

when the frequency of the minor genotype/subtype calls among all reads mapped for a particular sample reached 3%, as a conservative threshold to exclude minor NGS noise or cross-contamination between samples.

Genotyping/subtyping results obtained with this tool were compared with those obtained by maximum likelihood phylogenetic analysis from consensus sequences, as described.⁽²³⁾ The consensus sequences were generated from the dominant nucleotides at each respective position in mpileup files using BWA-mem and SAMtools 1.7.^(24,25) Two samples were included as controls: a sample containing a mixed infection 1b/3a (24%/76% proportion) and another one with genotype 5 (which is rare in Spain).

ESTIMATION OF THE INTRAHOST HCV GENETIC DIVERSITY

NS5B NGS data were filtered and analyzed as described elsewhere,⁽¹⁷⁾ and then the Shannon entropy (SE) genetic diversity estimate was calculated.⁽¹⁶⁾ Briefly, SE describes the intrahost diversity of the viral population as a whole, considering the number and the frequency of viral haplotypes within the infected individual. In order to calculate SE values, NGS data were normalized between samples by

randomly selecting an equal number of reads post-quality filtering for all samples in each sequencing run and repeated 100 times. The mean SE values from these 100 bootstraps were then assigned to each sample. To evaluate the robustness of the SE estimate, a sensitivity analysis was performed through a bootstrap analysis comparing these SE values to those obtained when all post-quality-filtered reads were used for each sample.

IDENTIFICATION OF ACUTE HCV INFECTIONS

The classification of infections as either acute (≤ 6 months) or chronic at the population level was based on SE values obtained from NS5B NGS data, as described.⁽¹⁶⁾ The optimal SE cutoff was calculated by using a set of well-defined acute ($n = 11$) and chronic ($n = 28$) cases from the latter study of HCV seroconverters with known dates of infection.⁽¹⁶⁾ Additional acute ($n = 4$) and chronic ($n = 12$) cases from the HepCdetect II study were also included; acute infection controls were HCV RNA-positive cases within the antibody window period (HCV antibodies not detected in plasma), and for chronic infection controls the date of HCV diagnosis was known and over 5 years before participating in the study. None and five of the acute and chronic controls, respectively, were HIV-positive.

ESTIMATION OF HCV INCIDENCE

The incidence was estimated based on the methodology described by Hope et al.⁽²⁶⁾ but additionally taking into account the false positivity rate observed in the well-characterized control set:

$$I = \frac{\left(\frac{365}{T}\right) \times (n - (FP \times n))}{[N - (n - (FP \times n))] + \left[\left(\frac{365}{T}\right) \times (n - (FP \times n))\right]}$$

In this equation, I represents incidence, T is the estimated period of time below the SE cutoff, n is the number of incident infections (acute infections from NGS analysis), N is the number of susceptible (HCV RNA-negative and those classified as acute infection by NGS), and FP is the false-positive rate of recent infection estimation. The period of time after

infection during which SE values remain below the cutoff was derived from the upper and lower values of the interquartile range (IQR) observed in the seroconverters study (median, 81 days; IQR, 48-155 days).⁽¹⁶⁾

PHYLOGENETIC CLUSTER ANALYSIS

A phylogenetic cluster analysis was performed from NS5B NGS data to estimate transmission networks, as described.⁽¹⁷⁾ Briefly, maximum likelihood phylogenies were reconstructed using FastTree, version 2.1.10, under a general time-reversible model of molecular evolution from all detected HCV variants of the NS5B region supported by at least five identical reads.⁽²⁷⁾ Pairs/clusters were excluded if they were polyphyletic or if the tree support threshold was < 0.60 . A flexible threshold based on the median of the intrahost patristic distances calculated from NGS data for each individual was used to identify pairs/clusters. For this analysis, variants from the dominant subtype were used.

Moreover, a subset of plasma samples ($n = 59$) was subjected to core-E2 region sequencing and phylogenetic analysis given its high discriminatory power for the identification of transmission clusters. These samples were also representative of the different HCV genotypes/subtypes found in study participants. A 1,534-bp fragment covering the core, the E1, and the beginning of the E2 regions (nucleotide positions 278-1811 of the HCV H77 reference genome) was amplified and sequenced as described,⁽²⁸⁾ with slight modifications (Supporting Text 1). Maximum likelihood phylogenetic analysis was then performed as described,⁽²³⁾ including reference sequences obtained from the International Committee on Taxonomy of Viruses database (version 1.6.17; <https://talk.ictvonline.org>). Genetic pairs/clusters were identified using a bootstrap threshold of 90% and a genetic distance threshold of 0.05,⁽²⁰⁾ and identified clusters were individually assessed. Pairwise genetic distances were calculated using Mega 6.⁽²⁹⁾

STATISTICAL ANALYSIS

For the comparison of diversity estimates between the 16 DBS/plasma pairs, the number of NGS reads post-quality filtering and the SE values obtained from DBS and plasma were compared with the Mann-Whitney U test.

TABLE 1. Sociodemographic and Biobehavioral Profile of HCV Viremic Participants and Differences Among Those Who Were Subjected to NS5B NGS and Those Who Were Not

Characteristics	NGS (n = 220), n (%)	No NGS (n = 45), n (%)	Total (N = 265), n (%)	P
Sociodemographic characteristics				
Age ≤ 30 years	17 (7.7)	6 (13.3)	23 (8.7)	0.224
Male gender	192 (87.3)	35 (77.8)	227 (85.7)	0.098
Foreign origin	68 (30.9)	12 (26.7)	80 (30.2)	0.572
Educational attainment > primary	73 (33.2)	16 (35.6)	89 (33.6)	0.759
Homeless*	34 (15.5)	6 (13.3)	40 (15.1)	0.717
Paid employment*	50 (24.8)	9 (22.5)	59 (24.4)	0.762
Ever been in prison	146 (66.4)	30 (66.7)	176 (66.4)	0.969
Biobehavioral characteristics				
New injection (≤5 years of injected drug use)	36 (16.4)	6 (13.3)	42 (15.8)	0.612
Injection while in prison	56 (27.6)	10 (23.3)	66 (26.8)	0.560
Injecting less than daily*	111 (51.2)	20 (44.4)	131 (50.0)	0.413
Cocaine as the most frequently injected drug*	53 (24.2)	17 (37.8)	70 (26.5)	0.060
Sharing of syringes	96 (43.8)	28 (62.2)	124 (47.0)	0.024
Sharing of other injection equipment	120 (54.8)	30 (66.7)	150 (56.8)	0.143
Practicing front-backloading	64 (29.8)	21 (46.7)	85 (32.7)	0.028
Drug snorting	107 (50.5)	29 (67.4)	136 (53.3)	0.042
Sharing cocaine snorting straw	81 (38.8)	22 (52.4)	103 (41.0)	0.101
Drug smoking	87 (41.4)	24 (57.1)	111 (44.0)	0.061
Currently in treatment for drug dependence	128 (58.2)	29 (64.4)	157 (59.2)	0.436
Unprotected sex with penetration with sex worker, PWID, HIV-positive, or MSM individuals [†]	48 (23.0)	15 (33.3)	63 (24.8)	0.144
Exchange of sex for drugs or money [†]	20 (9.1)	5 (11.1)	25 (9.5)	0.680
Self-reported HIV infection or positive rapid test	53 (24.1)	15 (33.3)	68 (25.7)	0.196
Self-reported STI [†]	21 (9.8)	2 (4.5)	23 (8.9)	0.267
Unaware of HCV status	71 (36.2)	5 (31.3)	76 (35.8)	0.690

*Previous 6 months.

[†]Previous 12 months.

P values < 0.05 are highlighted in bold to aid visualization.

Abbreviations: MSM, men who have sex with men; STI, sexually transmitted infection.

In order to identify acute infections from SE values, the SE cutoff value that yielded the highest sensitivity and specificity was selected by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Then, the area under the ROC curve (AUROC), sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value were calculated together with their 95% CIs.

Proportions were compared between viremic participants subjected to NGS versus those who were not, using the Pearson χ^2 and the Fisher exact tests. Univariate and multivariate logistic regression models were applied for the analysis of determinants of acute infection and phylogenetic clustering. Variables with a significance level <0.10 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis. Final multivariate models were derived using a stepwise backward elimination process. ORs with their 95% CIs were calculated.

Phylogenetic clustering agreement between the core-E2 Sanger sequencing and NS5B NGS methodologies was performed by calculating the kappa statistic with its 95% CI. The Pearson χ^2 test was used to study whether individuals with acute infection were more likely to form a pair/cluster with individuals with another acute infection or chronic infection. The cutoff for statistical significance was set at $P < 0.05$. All analyses were performed using SPSS, version 17.0.

Results

PARTICIPANT CHARACTERISTICS

The sociodemographic and behavioral profile of study participants is shown in Table 1. Briefly, most

of participants were male (85.7%), and 8.7% were ≤ 30 years old. Foreign PWID accounted for 30.2%, and 15.8% reported ≤ 5 years of injected drug use. NS5B NGS data were not obtained for all viremic patients (mostly due to amplification failure in those with lower viral loads), but the sociodemographic characteristics of those successfully subjected to NGS were not significantly different from those who were not. However, regarding drug use behavior, the latter were more likely to share syringes ($P = 0.024$), practice front-loading ($P = 0.028$), and snort drugs ($P = 0.042$).

Among viremic participants, 1.9% (4/265) were within the antibody window period (HCV RNA-positive and antibody-negative by both point-of-care and standard serology testing in plasma). These four participants, all of whom were HIV-negative, constituted the acute infection controls.

NS5B NGS OUTPUT

Sample processing and NGS output are summarized in Fig. 1. When considering only participants with viral loads $\geq 10,000$ IU/mL in plasma (183/203), 93.4% (171/183) of plasma samples were successfully characterized by NGS. Among participants for whom only DBS samples were obtained ($n = 62$), there was not enough sample left in 3 cases, and NGS was successful in 83.1% (49/59) of the remaining samples. Among the 220 samples sequenced, the median number of reads post-quality filtering per sample was 10,075 (IQR, 7,675-13,875).

VALIDATION OF DBS SAMPLES FOR THE ESTIMATION OF THE INTERHOST AND INTRAHOST HCV GENETIC DIVERSITY

Regarding interhost diversity, genotyping and subtyping results obtained by phylogenetic analysis of NGS consensus sequences were fully concordant in 16 paired plasma/DBS samples with varying viral loads (range, 4.20-6.78 $\log[\text{IU/mL}]$); HCV genotypes/subtypes: seven 1a, three 1b, two 3a, one 4a, two mixed genotype infections 1a/4a, and one mixed subtype infection 1a/1b). In fact, no nucleotide difference was observed between the consensus sequences generated from plasma/DBS pairs. Regarding intrahost diversity, SE measures showed no significant differences between plasma and DBS samples ($P = 0.734$) (Fig. 2).

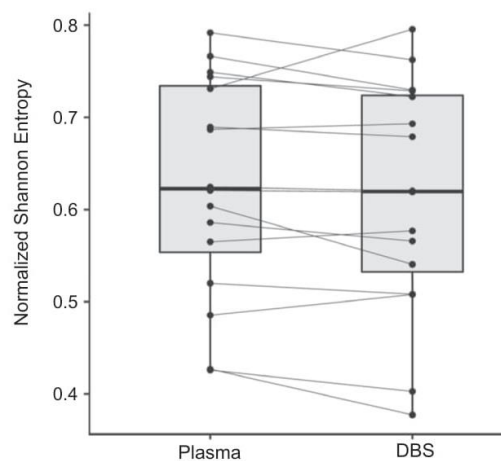


FIG. 2. Boxplot and dot plot of SE values between plasma and DBS pairs.

CIRCULATING HCV GENOTYPES/SUBTYPES

Genotyping/subtyping results obtained with the HCVGenoTool were concordant with those obtained by phylogenetic analysis of NGS consensus sequences, and the results of the genotype 5 and mixed infection controls were satisfactory (Supporting Table S1). HCV genotypes and subtypes found in study participants ($N = 220$) are shown in Fig. 3. Five mixed infections (2.2%) were detected: two 4a/1a, one 1a/1b, one 1a/3a, and one 1a/4d. Subtype 1a predominated in Spanish participants (46.0%, 70/152), followed by 3a (29.6%, 45/152), whereas 3a (42.6%, 29/68) predominated over 1a (25.0%, 17/68) among foreign PWID ($P = 0.006$), who were mostly from Georgia (39.7%) and Italy (13.2%).

IDENTIFICATION OF ACUTE HCV INFECTION AND ITS DETERMINANTS

In order to compare SE values among participants, the number of reads used to calculate SE was normalized between all samples in each sequencing run (median, 4,205; range, 4,074-6,822), which represented using a median of 46.5% of the reads (IQR, 35.0-61.6%). In the sensitivity analysis, SE values

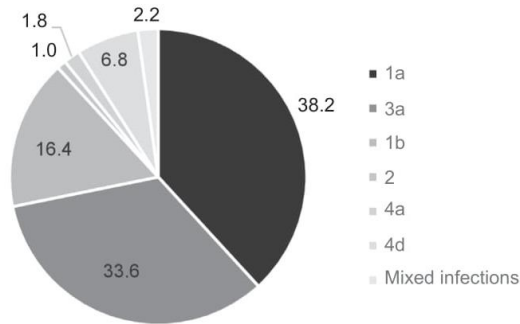


FIG. 3. HCV genotypes/subtypes found in the study population (n = 220).

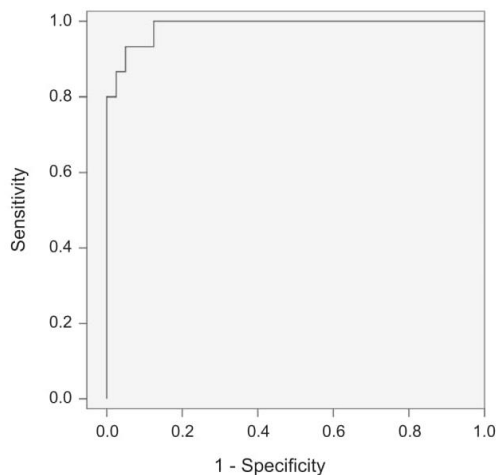


FIG. 4. ROC curve plot for the identification of acute infection from NS5B SE values in a set of well-defined acute and chronic controls. AUROC = 0.987.

did not significantly vary when 100% of the reads were used (Supporting Fig. S1). A ROC curve was obtained for SE values in the set of well-defined acute and chronic controls, and an AUROC of 0.987 (95% CI, 0.96-1.00) was obtained (Fig. 4). Selecting an SE value of 0.41040 as the cutoff yielded 93.3% sensitivity (95% CI, 0.81-1.06), 95.0% specificity (95% CI, 0.88-1.02), 87.5% positive predictive value (95% CI, 0.71-1.04), and 97.4% negative predictive value (95% CI,

0.92-1.02) for the identification of acute HCV infection. When this cutoff was used in the whole study population, 13.5% (29/215) of the participants were classified as acute HCV infections. The previously mentioned five HCV mixed infections were excluded from this analysis because the methodology was not validated in this context. Acute infections identified by SE values represented either primary infections or reinfections as 48.3% (14/29) of the cases had been previously diagnosed with HCV over 1 year before participating in the study and had cleared the infection either with treatment (n = 5) or spontaneously (n = 9).

In unadjusted logistic regression analyses (Table 2), acute infection was associated with age <30 years, ≤5 years of injected drug use, sharing cocaine snorting straws, genotype 3a, and being unaware of their viremic HCV status. In adjusted logistic regression analyses, independent risk factors for acute infection were age <30 (OR, 8.09), injecting less than daily (OR, 4.35), ≤5 years of injected drug use (OR, 3.43), sharing cocaine snorting straws (OR, 2.89), and being unaware of their viremic HCV status (OR, 3.62).

ESTIMATION OF HCV INCIDENCE

Estimated annualized HCV incidence, including reinfections, varied from 31 per 100 person-years (when the highest value of the IQR of the time period during which SE values fall below the cutoff was considered: 155 days) to 59 per 100 person-years (when the lowest value of the IQR was used: 48 days).

PHYLOGENETIC CLUSTERING AND ASSOCIATED FACTORS

Among the participants subjected to NS5B NGS analysis, 46.8% (103/220) were identified as part of a transmission pair or cluster (involving 6-29 participants) (Fig. 5). Among those PWID with an acute infection who belonged to a transmission pair/cluster, 82.6% (19/23) clustered with another acutely infected participant and were more likely to form a pair/cluster with another acutely infected individual than those with a chronic infection ($P = 0.001$). There was no evidence of clustering by country of origin, although some clusters contained more than one foreign PWID (data not shown).

TABLE 2. Univariate and Multivariate Logistic Regression Analyses of Factors Associated With Acute HCV Infection

	Acute Infection (n = 29), n (%)	Chronic Infection (n = 186), n (%)	Total* (N = 215), n (%)	Univariate Model			Multivariate Model		
				OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Sociodemographic characteristics									
Age ≤ 30 years	8 (27.6)	7 (3.8)	15 (7.0)	9.74	3.18-29.411	<0.001	8.09	1.99-33.33	0.004
Male gender	24 (82.8)	164 (88.2)	192 (87.4)	0.64	0.22-1.87	0.644			
Foreign origin	10 (34.5)	56 (30.1)	66 (30.7)	1.22	0.53-2.81	0.637			
Educational attainment > primary	20 (69.0)	124 (66.7)	147 (66.8)	0.90	0.39-2.10	0.807			
Homeless [†]	3 (10.3)	31 (16.7)	34 (15.8)	0.57	0.16-2.04	0.392			
Paid employment [†]	7 (25.9)	41 (24.0)	50 (22.7)	1.11	0.44-2.82	0.826			
Ever been in prison	20 (69.0)	125 (67.2)	145 (67.4)	1.08	0.46-2.53	0.850			
Biobehavioral characteristics									
New injection (≤5 years of injected drug use)	11 (37.9)	23 (12.4)	34 (15.8)	4.33	1.81-10.37	0.001	3.43	1.04-11.32	0.043
Injection while in prison	4 (14.3)	52 (30.4)	56 (28.1)	0.38	0.13-1.16	0.090			
Injecting less than daily [†]	19 (67.9)	90 (48.9)	109 (51.4)	2.22	0.94-5.26	0.068	4.35	1.41-14.29	0.011
Cocaine as the most frequently injected drug [†]	7 (24.1)	45 (24.3)	52 (24.3)	0.99	0.39-2.48	0.982			
Sharing of syringes	11 (37.9)	83 (44.9)	94 (43.9)	0.75	0.75-1.69	0.486			
Sharing of other injection equipment	15 (51.7)	102 (55.1)	117 (54.7)	0.87	0.39-1.92	0.732			
Practicing front-backloading	8 (27.6)	54 (29.8)	62 (29.5)	0.90	0.37-2.16	0.808			
Drug snorting and sharing snorting straw	16 (57.1)	64 (36.2)	80 (39.0)	2.35	1.04-5.32	0.040	2.89	1.08-7.75	0.035
Drug smoking	14 (50.0)	71 (39.9)	85 (41.3)	1.51	0.67-3.37	0.316			
Currently in treatment for drug dependence	14 (48.3)	112 (60.2)	126 (58.6)	1.62	0.74-3.57	0.230			
Unprotected sex with penetration with sex worker, PWID, HIV-positive, or MSM individuals [‡]	7 (25.0)	39 (22.2)	46 (22.5)	1.17	0.46-2.98	0.740			
Exchange of sex for drugs or money [‡]	4 (13.8)	16 (8.6)	20 (9.5)	1.69	0.52-5.49	0.381			
Self-reported HIV infection or positive rapid test	7 (24.1)	46 (23.7)	51 (23.7)	1.03	0.41-2.58	0.955			
Self-reported STI [‡]	4 (13.8)	16 (8.8)	20 (9.5)	1.65	0.51-5.38	0.404			
Unaware of HCV status	17 (60.7)	53 (32.3)	70 (36.5)	3.24	1.41-7.41	0.006	3.62	1.36-9.62	0.010
Virological characteristics									
Genotype 3a	15 (51.7)	59 (31.7)	74 (34.4)	2.31	1.04-5.04	0.040			
Genotype 1a	8 (27.6)	76 (40.9)	84 (39.1)	0.55	0.23-1.31	0.179			

*Five cases with mixed HCV infections were excluded from this analysis.

[†]Previous 6 months.

[‡]Previous 12 months.

P values < 0.05 are highlighted in bold to aid visualization.

Abbreviations: MSM, men who have sex with men; STI, sexually transmitted infection.

Amplification and Sanger sequencing of the core-E2 genomic region was successful for 71.2% (42/59) of the samples (viral load range, 4.65-7.37 log[IU/mL]; HCV subtypes: 1a, 1b, 3a, 4a, and 4d). When the clusters identified by phylogenetic analysis of the core-E2 region were compared with those

identified from the NS5B NGS data, the positive agreement was 85.7% ($\kappa = 0.68$; 95% CI, 0.44-0.92). Two participants belonging to a transmission cluster by NS5B analysis were not identified by core-E2 analysis, and 4 participants were clustered by core-E2 analysis but not by NS5B analysis (data not shown).

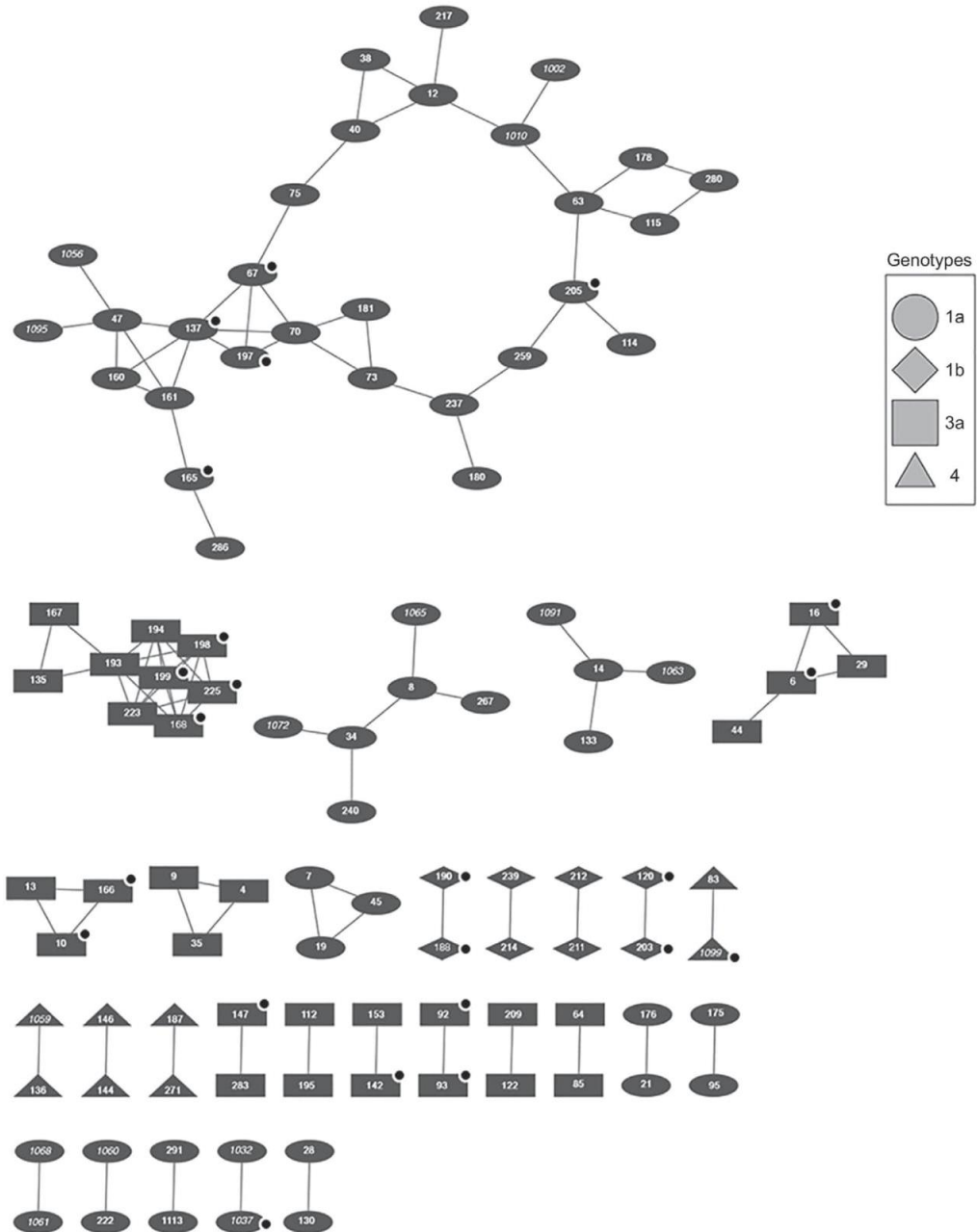


FIG. 5. Cluster network derived from the maximum likelihood phylogeny reconstructed from the NS5B NGS data set. Participants with an acute infection are identified by a black dot. The links between each node are scaled by the corresponding distances in the maximum likelihood phylogeny reconstructed from the NS5B consensus sequences, and the linkages are derived from NGS data. The participants' identification number is shown in bold for plasma samples (largest harm reduction center) and in italics for DBS samples (the other three centers).

TABLE 3. Univariate and Multivariate Logistic Regression Analyses of Factors Associated With HCV Belonging to a Transmission Pair/Cluster

	Pair/Cluster (n = 103), n (%)	No Cluster (n = 117), n (%)	Total (N = 220), n (%)	Univariate Model			Multivariate Model		
				OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Sociodemographic characteristics									
Age ≤ 30 years	14 (13.6)	3 (2.6)	17 (7.7)	5.98	1.65-21.74	0.007	6.16	1.21-31.21	0.029
Male gender	89 (40.5)	103 (46.8)	192 (87.3)	0.86	0.39-1.92	0.719			
Foreign origin	28 (27.2)	40 (34.2)	68 (30.9)	0.72	0.40-1.29	0.264			
Educational attainment > primary	36 (35.0)	37 (31.6)	73 (33.2)	1.16	0.66-2.04	0.602			
Homeless*	18 (17.5)	16 (13.7)	34 (15.5)	1.34	0.64-2.79	0.643			
Paid employment*	25 (26.9)	25 (22.9)	50 (24.8)	1.24	0.65-2.35	0.518			
Ever been in prison	70 (68.0)	76 (65.0)	146 (66.4)	1.14	0.65-2.01	0.639			
Biobehavioral characteristics									
New injection (≤5 years of injected drug use)	22 (21.4)	14 (12.0)	36 (16.4)	2.00	0.96-4.17	0.065			
Injection while in prison	27 (28.4)	29 (26.9)	56 (27.6)	1.08	0.58-2.01	0.803			
Injecting less than daily*	54 (52.4)	57 (50.0)	111 (51.2)	0.90	1.56-0.53	0.721			
Cocaine as the most frequently injected drug*	30 (29.4)	23 (19.7)	53 (24.2)	1.72	0.91-3.18	0.096			
Sharing of syringes	46 (44.7)	50 (43.1)	96 (43.8)	1.06	0.62-1.82	0.817			
Sharing of other injection equipment	62 (60.2)	58 (50.0)	120 (54.8)	1.51	0.88-2.60	0.136			
Practicing front-backloading	33 (32.7)	31 (27.2)	64 (29.8)	1.30	0.72-2.34	0.382			
Drug snorting and sharing snorting straw	41 (42.3)	40 (35.7)	81 (38.8)	1.32	0.75-2.31	0.334			
Drug smoking	44 (44.9)	43 (38.4)	87 (41.4)	1.31	0.75-2.28	0.341			
Currently in treatment for drug dependence	56 (54.4)	72 (61.5)	128 (58.2)	1.34	0.78-2.30	0.284			
Unprotected sex with penetration with sex worker, PWI, HIV-positive, or MSM individuals†	25 (25.3)	23 (20.9)	48 (23.0)	0.73	0.28-1.87	0.511			
Exchange of sex for drugs or money‡	8 (7.8)	12 (10.3)	20 (9.1)	1.28	0.67-2.44	0.457			
Self-reported HIV infection or positive rapid test	27 (26.2)	26 (22.2)	53 (24.1)	1.24	0.67-2.31	0.491			
Self-reported STI†	12 (11.9)	9 (7.9)	21 (9.8)	1.57	0.63-3.92	0.330			
Unaware of HCV status	38 (39.2)	33 (33.3)	71 (36.2)	1.29	0.71-2.32	0.396			
Virological characteristics									
Acute infection by NS5B NGS	23 (22.3)	6 (5.1)	29 (13.2)	5.19	2.01-13.33	0.001	5.73	2.04-16.13	0.001
Genotype 3a	31 (30.1)	43 (36.8)	74 (33.6)	0.74	0.42-1.31	0.299			
Genotype 1a	56 (54.4)	31 (26.5)	87 (39.5)	3.31	1.87-5.85	<0.001	4.78	2.56-8.93	<0.001

*Previous 6 months.

†Previous 12 months.

‡P values < 0.05 are highlighted in bold to aid visualization.

Abbreviations: MSM, men who have sex with men; STI, sexually transmitted infection.

Concerning determinants, age ≤ 30 years (OR, 6.16), having an acute infection (OR, 5.73), and infection with subtype 1a (OR, 4.78) were associated with clustering in unadjusted logistic regression analysis and remained independently associated factors in adjusted logistic regression analysis (Table 3).

Discussion

In this study we comprehensively characterized the local HCV epidemics in current PWID through the estimation of different key parameters (such as incidence and transmission networks) and their determinants by performing several virological analyses based on HCV genetic diversity at interhost and intrahost levels by NGS, which allowed us to identify acute infections, circulating subtypes, and epidemiological relatedness between them. This methodology, initially developed from plasma samples,⁽¹⁶⁾ has also proved feasible from minimally invasive DBS samples, adding to previous results from the HepCdetect II study showing the utility of DBS to improve access to diagnosis and to estimate the prevalence of viremic HCV infection in the HRS setting in Catalonia.⁽¹³⁾

We evaluated the usefulness of DBS samples for the study of HCV genetic diversity at both interhost and intrahost levels by NGS. Regarding interhost diversity, the HCV genotype and subtype obtained from plasma/DBS pairs were concordant in all cases, as reported based on Sanger sequencing.⁽³⁰⁾ Furthermore, the SE intrahost genetic diversity estimate obtained from NGS reads was comparable in both specimen types. Thus, DBS samples proved to be highly suitable for the identification of acute infections based on SE values when using a methodology developed for plasma samples.⁽¹⁶⁾

While other assays have been developed for HCV genotyping by NGS,^(31,32) both the NS5B-based experimental approach and the bioinformatic analysis used here are simple methods; the HCVGenoTool developed here is easy to use for nonbioinformaticians and performed well in comparison with the reference method. The distribution of subtypes circulating in current PWID was comparable to a national study of people who had injected drugs,⁽³³⁾ with a higher prevalence of subtype 3a in our study (33.6% versus 26.5%). This subtype predominated in foreign PWID as it is highly prevalent in PWID in countries such as

Georgia (70.0%) or Italy (39.7%),⁽³⁴⁾ which were highly represented among study participants. Genotype 3 has been associated with a higher risk of developing liver disease and HCC⁽³⁵⁾ and a lower response to certain direct-acting antivirals.⁽³⁶⁾ Nevertheless, highly sustained virological response rates have been recently shown in PWID,⁽³⁷⁾ even in those with recent injection and imperfect adherence.⁽³⁸⁾

Based on NS5B NGS data, acute infections were characterized among PWID attending HRS in Catalonia. This method showed excellent accuracy (AUROC, 0.99; 93.3% sensitivity and 95.0% specificity), confirming previous results in a cohort of seroconverters in Canada.⁽¹⁶⁾ While initially only 4 viremic PWID in the HepCdetect II study were identified as acutely infected based on HCV RNA detection within the antibody window period,⁽¹³⁾ when using the methodology described here 25 additional acute infections were identified, adding up to 29/215 (13.5%). Given the difficulty in detecting acute infections through traditional methods, alternative approaches have been described, such as anti-HCV antibody avidity. However, the latter method is influenced by several factors including poor immune status in people living with HIV.⁽³⁹⁾ HIV infection was found in 26.2% of acutely infected HCV cases in the present study.

Importantly, accurate identification of acute infections allowed estimation of HCV incidence in current PWID, which was between 31 and 59/100 person-years. These results are consistent with a longitudinal study in a cohort of HCV seroconverters among young heroin injectors in Spain (52.9/100 person-years, 2001-2003 period)⁽⁴⁰⁾ and in the upper range of a pooled analysis in seroconverter PWID from big cities of Western countries (7-33/100 person-years).⁽⁴¹⁾ However, the high incidence observed can be also explained by the methodology used (based on SE estimates), which has not been validated to distinguish between new infections and reinfections. Indeed, 48.3% of the acute infections identified in our study might represent reinfections. These results are in line with preliminary results from an ongoing study conducted in one of the HRS that participated in the present study (the one that contributed the largest number of participants), in which a high rate of reinfection after on-site treatment with a direct-acting antiviral was found (18/100 person-years).⁽⁴²⁾ Accurate incidence estimates are required to monitor

the WHO elimination goal of 80% reduction in incidence and to measure the effectiveness of HCV prevention interventions including harm reduction. The fact that HCV incidence remains high in our context, where HRS are well implemented, emphasizes the need for further improvement in counseling and drug dependence treatment as preventive measures, diagnosis of viremic HCV infection, and access to antiviral treatment.

In this sense, we were able to describe the determinants of acute HCV infection, which is essential to design preventive measures specifically targeted to those PWID involved in transmission.⁽¹⁴⁾ These determinants were being young, recent initiation to injected drug use, injecting less than daily, sharing cocaine snorting straws, and being unaware of viremic HCV status. Special attention should be paid to young injectors, who were at higher risk of both acute infection (OR, 8.09) and being in a transmission pair/cluster (OR, 5.98). Youth has also been identified as a risk factor for clustering in Canada,⁽²⁰⁾ as well as for clustering with another young injector.⁽¹⁸⁾ Young age has been related to high-risk injecting practices, such as sharing syringes or other injecting equipment and inducing other people who use drugs to inject for the first time.⁽⁴³⁾ Therefore, innovative outreach interventions and prevention messages specifically tailored to young PWID may help to decrease HCV transmission. Additionally, those with an acute infection were more likely to share snorting straws and to inject less than daily, possibly indicating a transition from non-injected to injected drug use, which usually happens among young PWID.⁽⁴⁴⁾ Despite controversy, the intranasal HCV transmission route has been virologically demonstrated.⁽⁴⁵⁾ Although the use of noninjected drugs has been recommended by public health authorities in order to reduce bloodborne infections, dependence, and overdose,⁽⁴⁶⁾ education regarding safe consumption through drug snorting should be reinforced. The association between ≤ 5 years of injected drug use and acute infection was expected because HCV infection in our setting often occurs during the first years of injection.^(13,47) The high unawareness of having a viremic infection among acutely infected individuals highlights missed opportunities to prevent HCV transmission. Being aware of having hepatitis C is the first step to linkage to care and treatment and to decrease injection risk behaviors.⁽⁴⁸⁾ Thus, the implementation of on-site testing (based on either

DBS⁽¹³⁾ or molecular point-of-care⁽⁴⁹⁾ tests as in the HepCdetect II study) and frequent HCV RNA testing⁽¹⁵⁾ are recommended to promote early diagnosis and self-knowledge of having hepatitis C to ultimately reduce transmission among PWID.

Regarding clustering, phylogenetic analysis of NS5B NGS data performed well and showed a higher amplification success rate in comparison with Sanger sequencing of the more variable core-E2 region.^(14,28) A large proportion (46.8%) of PWID were identified as being part of a pair/cluster, and acute infection was its strongest determinant (OR, 5.73), in agreement with Jacka et al.⁽²⁰⁾ Acutely infected individuals were more likely to cluster with another acutely infected PWID than with chronically infected individuals. The higher risk of transmitting HCV infection to others during acute infection and the close epidemiological relationship between acutely infected PWID within the transmission network suggest the need not only for improved prevention and diagnosis but also for treatment-as-prevention strategies⁽¹⁵⁾ in order to promptly treat acutely infected PWID,^(4,5) ideally at the same time as their injecting partners.

Despite the strengths of our study, the following limitations should be taken into consideration. Firstly, 8.7% of the participants' samples were not subjected to NGS, mostly due to low viral loads, which may be found during acute infection, when HCV RNA levels may fluctuate.⁽⁵⁰⁾ Therefore, it is possible that some of the participants for whom HCV was not sequenced might have been acutely infected, leading to an underestimation of HCV incidence and influencing the analysis of determinants of acute infection. Secondly, the relatively small number of acute infections found may have led to a limited statistical power when assessing associated risk factors. Thirdly, clustering analysis may have been limited by the fact that about 20% of people spontaneously clear HCV infection and that not all contacts of study participants were sampled. Finally, the proportion of mixed infections might have been underestimated in this study as the limit of detection of minor genotypes/subtypes by the NGS method described was not established. However, we estimate a high representativity of viral variants circulating in each individual given the relatively high depth of coverage obtained.

In conclusion, the present study demonstrates the usefulness of DBS as an alternative sample for the study of HCV diversity, not only at the interhost

(genotypes/subtypes) but also at the intrahost level, which is useful for the identification of acute infections and transmission clusters. These data allowed us to estimate incidence in a cross-sectional study and, together with classical epidemiological data, to characterize the ongoing HCV epidemic among current PWID attending HRS in Catalonia. The described methodology could also be useful in other settings or populations with high HCV incidence. Early diagnosis of acute infections by frequent HCV RNA testing and linkage to treatment, especially among younger users and people who have recently started to inject drugs, as well as the design and reinforcement of specifically targeted harm reduction interventions, will be key in order to prevent ongoing transmission and reach HCV elimination goals.

Acknowledgment: We especially acknowledge the PWID who participated in this study. We also thank all the other members of the HepCdetect II Study Group: Núria Ibáñez, Xavier Majó, Laia Gasulla (Public Health Agency of Catalonia), Noemí González (El Local, Fundació Institut per la Promoció Social i la Salut), Sonia Cebrián (Associació d'intervenció en Drogodependències d'Egara ONG, Terrassa), Jaume Minguell (Fundació AMBIT Prevenció), Aitor Remírez (AEC GRIS Fundació Privada), Rafael Muñoz and Victoria González (CEEISCAT), and Jordi Hernández (Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol). We also are grateful for the collaboration of all the other professionals at HRS: Dulce García, Vicente Cruz, Jennifer Hueltes, Judit Rebollo, Cristina Martínez, Marta Heras, Laura Quesada, Dídac Prat, and David Herrero. We also thank Oliver Valero (Servei d'Estadística Aplicada, Universitat Autònoma de Barcelona) for his support in carrying out the multivariate logistic regression models, and Tanya L. Applegate and François M.J. Lamoury for sharing the experimental protocol for the core-E2 region. Finally, we also thank the Genomics Platform and the High Content Genomics & Bioinformatics Unit at Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, and Harvey Evans for style corrections.

Author Contributions: A.A., performed the experiments, formal analysis, investigation, writing – original draft. V.M., formal analysis, investigation, methodology, resources, software, writing – original draft. D.P.,

formal analysis, methodology, software, writing – original draft. L.S., formal analysis, methodology, resources, software, writing – review & editing. J.J., methodology, interpretation of data, resources, supervision, writing – review & editing. M.K., methodology, interpretation of data, resources, supervision, writing – review & editing. S.G.G., performed the experiments, writing – review & editing. C.F., data curation, interpretation of data, investigation, writing – review & editing. J.C., interpretation of data, resources, supervision, writing – review & editing. L.M., interpretation of data, resources, supervision, writing – review & editing. J.C., interpretation of data, resources, supervision, writing – review & editing. V.S., conceptualization, performed the experiments, formal analysis, investigation, methodology, supervision, writing – original draft. E.M., conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, software, supervision, writing – original draft.

REFERENCES

- 1) Grebely J, Larney S, Peacock A, Colledge S, Leung J, Hickman M, et al. Global, regional, and country-level estimates of hepatitis C infection among people who have recently injected drugs. *Addiction* 2019;114:150-166.
- 2) European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis C. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- 3) Barbosa C, Fraser H, Hoerger TJ, Leib A, Havens JR, Young A, et al. Cost-effectiveness of scaling-up HCV prevention and treatment in the United States for people who inject drugs. *Addiction* 2019;114:2267-2278.
- 4) Pawlowsky J-M, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J Hepatol* 2018;69:461-511.
- 5) Chung RT, Ghany MG, Kim AY, Marks KM, Naggie S, Vargas HE, et al. Hepatitis C guidance 2018 update: AASLD-IDSAS recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2018;67:1477-1492.
- 6) European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis C. Monitoring the Elimination of Viral Hepatitis as a Public Health Threat Among People Who Inject Drugs in Europe: The Elimination Barometer. Technical Reports. Luxembourg: ECDC; 2019.
- 7) World Health Organization. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021. Geneva, Switzerland: WHO; 2016.
- 8) World Health Organization. Guidelines on Hepatitis B and C Testing. Geneva, Switzerland: WHO; 2017.
- 9) Grebely J, Applegate TL, Cunningham P, Feld JJ. Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:1109-1115.
- 10) Chevaliez S, Wlassow M, Volant J, Roudot-Thoraval F, Bachelard A, Poiteau L, et al. Assessing molecular point-of-care testing and dried blood spot for hepatitis C virus screening in people who inject drugs. *Open Forum Infect Dis* 2020;7:ofaa196.
- 11) Lange B, Roberts T, Cohn J, Greenman J, Camp J, Ishizaki A, et al. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV RNA using dried blood spot (DBS)

- samples—a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17:693.
- 12) Grebely J, Bruneau J, Lazarus JV, Dalgard O, Bruggmann P, Treloar C, et al. Research priorities to achieve universal access to hepatitis C prevention, management and direct-acting antiviral treatment among people who inject drugs. *Int J Drug Policy* 2017;47:51-60.
 - 13) Saludes V, Antuori A, Folch C, González N, Ibáñez N, Majó X, et al. Utility of a one-step screening and diagnosis strategy for viremic HCV infection among people who inject drugs in Catalonia. *Int J Drug Policy* 2019;74:236-245.
 - 14) Olmstead AD, Joy JB, Montoya V, Luo I, Poon AFY, Jacka B, et al. A molecular phylogenetics-based approach for identifying recent hepatitis C virus transmission events. *Infect Genet Evol* 2015;33:101-109.
 - 15) Martinello M, Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ, Matthews GV. Management of acute HCV infection in the era of direct-acting antiviral therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:412-424.
 - 16) Montoya V, Olmstead AD, Janjua NZ, Tang P, Grebely J, Cook D, et al. Differentiation of acute from chronic hepatitis C virus infection by nonstructural 5B deep sequencing: a population-level tool for incidence estimation. *HEPATOLOGY* 2015;61:1842-1850.
 - 17) Montoya V, Olmstead A, Tang P, Cook D, Janjua N, Grebely J, et al. Deep sequencing increases hepatitis C virus phylogenetic cluster detection compared to Sanger sequencing. *Infect Genet Evol* 2016;43:329-337.
 - 18) Jacka B, Applegate T, Poon AF, Raghwan J, Harrigan PR, DeBeck K, et al. Transmission of hepatitis C virus infection among younger and older people who inject drugs in Vancouver, Canada. *J Hepatol* 2016;64:1247-1255.
 - 19) Sacks-Davis R, Daraganova G, Aitken C, Higgs P, Tracy L, Bowden S, et al. Hepatitis C virus phylogenetic clustering is associated with the social-injecting network in a cohort of people who inject drugs. *PLoS One* 2012;7:e47335.
 - 20) Jacka B, Applegate T, Krajden M, Olmstead A, Harrigan PR, Marshall BDL, et al. Phylogenetic clustering of hepatitis C virus among people who inject drugs in Vancouver, Canada. *HEPATOLOGY* 2014;60:1571-1580.
 - 21) Saludes V, Folch C, Morales-Carmona A, Ferrer L, Fernàndez-López L, Muñoz R, et al. Community-based screening of hepatitis C with a one-step RNA detection algorithm from dried-blood spots: analysis of key populations in Barcelona, Spain. *J Viral Hepat* 2018;25:236-244.
 - 22) Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007;45:1102-1112.
 - 23) Saludes V, Antuori A, Reinhardt B, Viciana I, Clavijo E, Schreiber L, et al. Reliable resolution of ambiguous hepatitis C virus genotype 1 results with the Abbott HCV Genotype Plus RUO assay. *Sci Rep* 2019;9:3678.
 - 24) Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-1760.
 - 25) Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078-2079.
 - 26) Hope VD, Hickman M, Ngui SL, Jones S, Telfer M, Bizzarri M, et al. Measuring the incidence, prevalence and genetic relatedness of hepatitis C infections among a community recruited sample of injecting drug users, using dried blood spots. *J. Viral Hepat* 2011;18:262-270.
 - 27) Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5:e9490.
 - 28) Lamoury FMJ, Jacka B, Bartlett S, Bull RA, Wong A, Amin J, et al. The influence of hepatitis C virus genetic region on phylogenetic clustering analysis. *PLoS One* 2015;10:e0131437.
 - 29) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-2729.
 - 30) Tuaille E, Mondain A-M, Meroueh F, Ottomani L, Picot M-C, Nagot N, et al. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *HEPATOLOGY* 2010;51:752-758.
 - 31) Olmstead AD, Montoya V, Chui CK, Dong W, Joy JB, Tai V, et al. A systematic, deep sequencing-based methodology for identification of mixed-genotype hepatitis C virus infections. *Infect Genet Evol* 2019;69:76-84.
 - 32) Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J Clin Microbiol* 2015;53:219-226.
 - 33) Aguilera A, Navarro D, Rodríguez-Frias F, Viciana I, Martínez-Sapiña AM, Rodríguez MJ, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *J Viral Hepat* 2017;24:725-732.
 - 34) Robaey G, Bielen R, Azar DG, Razavi H, Nevens F. Global genotype distribution of hepatitis C viral infection among people who inject drugs. *J Hepatol* 2016;65:1094-1103.
 - 35) McMahon BJ, Bruden D, Townshend-Bulson L, Simons B, Spradling P, Livingston S, et al. Infection with hepatitis C virus genotype 3 is an independent risk factor for end-stage liver disease, hepatocellular carcinoma, and liver-related death. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15:431-437.e2.
 - 36) Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, Fried MW, Segal JB, Sulkowski MS. Oral direct-acting agent therapy for hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2017;166:637.
 - 37) Hajarizadeh B, Cunningham EB, Reid H, Law M, Dore GJ, Grebely J. Direct-acting antiviral treatment for hepatitis C among people who use or inject drugs: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018;3:754-767.
 - 38) Cunningham EB, Amin J, Feld JJ, Bruneau J, Dalgard O, Powis J, et al. Adherence to sofosbuvir and velpatasvir among people with chronic HCV infection and recent injection drug use: the SIMPLIFY study. *Int J Drug Policy* 2018;62:14-23.
 - 39) Boon D, Bruce V, Patel EU, Quinn J, Srikrishnan AK, Shanmugam S, et al. Antibody avidity-based approach to estimate population-level incidence of hepatitis C. *J Hepatol* 2020;73:294-302.
 - 40) Vallejo F, Barrio G, Brugal MT, Pulido J, Toro C, Sordo L, et al. High hepatitis C virus prevalence and incidence in a community cohort of young heroin injectors in a context of extensive harm reduction programmes. *J Epidemiol Community Health* 2015;69:599-603.
 - 41) Morris MD, Shiboski S, Bruneau J, Hahn JA, Hellard M, Prins M, et al. Geographic differences in temporal incidence trends of hepatitis C virus infection among people who inject drugs: the InC3 collaboration. *Clin Infect Dis* 2017;64:860-869.
 - 42) Lens S, Miralpeix A, Galvez M, Martro E, Gonzalez N, Rodríguez-Tajes S, et al. Externalized HCV linkage-to-care cascade in the biggest harm reduction center in Barcelona: approaching a high-risk PWID population [Abstract]. *J Hepatol* 2020;73:S360.
 - 43) Mittal ML, Jain S, Sun S, DeBeck K, Milloy MJ, Hayashi K, et al. Opioid agonist treatment and the process of injection drug use initiation. *Drug Alcohol Depend* 2019;197:354-360.
 - 44) Baluku M, Wamala T. When and how do individuals transition from regular drug use to injection drug use in Uganda? Findings from a rapid assessment. *Harm Reduct J* 2019;16:73.
 - 45) Aaron S, McMahon JM, Milano D, Torres L, Clatts M, Tortu S, et al. Intranasal transmission of hepatitis C virus: virological and clinical evidence. *Clin Infect Dis* 2008;47:931-934.

ANTUORI ET AL.

HEPATOLOGY, Month 2021

- 46) Hunt PG, Mathew SN. Preventing and curtailing injecting drug use: a review of opportunities for developing and delivering "route transition interventions." *Drug Alcohol Rev* 1999;18:441-451.
- 47) Folch C, Casabona J, Espelt A, Majó X, Meroño M, Gonzalez V, et al. High prevalence and incidence of HIV and HCV among new injecting drug users with a large proportion of migrants—is prevention failing? *Subst Use Misuse* 2016;51:250-260.
- 48) Bruneau J, Zang G, Abrahamowicz M, Jutras-Aswad D, Daniel M, Roy É. Sustained drug use changes after hepatitis C screening and counseling among recently infected persons who inject drugs: a longitudinal study. *Clin Infect Dis* 2014;58:755-761.
- 49) Saludes V, Antuori A, Lazarus JV, Folch C, González-Gómez S, González N, et al. Evaluation of the Xpert HCV VL Fingerstick

- point-of-care assay and dried blood spot HCV RNA testing as simplified diagnostic strategies among people who inject drugs in Catalonia, Spain. *Int J Drug Policy* 2020;80:102734.
- 50) Hajarizadeh B, Grady B, Page K, Kim AY, McGovern BH, Cox AL, et al. Patterns of hepatitis C virus RNA levels during acute infection: the InC3 study. *PLoS One* 2015;10:e0122232.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31757/supinfo.