

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C
OCULTO EN VARIAS SITUACIONES
DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

TERESA OLEA TEJERO

Madrid, 2019

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C
OCULTO EN VARIAS SITUACIONES
DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

Tesis Doctoral presentada por: Teresa Olea Tejero

DIRECTOR DE TESIS: Rafael Selgas Gutiérrez

Madrid, 2019

A mi familia.

(...) no hay cuestiones pequeñas; las que lo parecen son
cuestiones grandes no comprendidas.

Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS

Quiero transmitir mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo llegara tan lejos.

En primer lugar quiero agradecer al director de esta tesis, el Dr. Rafael Selgas su dedicación, tiempo y paciencia así como la confianza puesta en mi desde el principio. Siempre me animó en los momentos adversos, demostrándome su gran calidad humana y profesional.

A los Dres. Inmaculada Castillo y Vicente Carreño, auténticos promotores y codirectores de este trabajo. Siempre respondieron a mis dudas. Sus aportaciones e inestimable ayuda han sido indispensables para que este trabajo, haya llegado hasta aquí.

A mis compañeros del servicio de Nefrología, en especial a Jorge Martínez-Ara, Alberto Torre, Carlos Jiménez, Elena González, María López-Oliva, María José Santana, Carmen Parejo, Teresa Pulido, Filo Trocoli, Concha Navarro, Mercedes Palacios, siempre dispuestos a colaborar con la mejor predisposición. En un grupo así ha sido un gusto embarcarse en esta aventura pues todo me lo han facilitado enormemente.

A la sección de Estadística, Charo Madero y Jesús Díez, por sus aportaciones en la organización, análisis e interpretación de los datos.

A mis padres, que espero que se sientan tan orgullosos de mí como yo de ellos.

A Luis, compañero incansable de viajes, soporte incondicional, sabio consejero, por enseñarme mediante el ejemplo, y poner orden en el caos.

A Nacho y Carlota, por apoyarme en todo momento, y alegrarnos en la distancia con los grandes avances de Marta y Pablo.

A Paloma, Pepe, Zeque, Pablo y demás familia, por compartir y enriquecer los momentos que pasamos juntos.

A mis amigos, por recordarme lo importante que es desconectar y por esos momentos inolvidables, que hacen la vida tan especial.

A Enrique de Portugal, por sus consejos y contribución “en la sombra”. Sin su ayuda este trabajo, no hubiera podido ser realizado.

Por último y no menos importante, quiero darles las gracias a todos y cada uno de los pacientes que han participado en estos estudios, pues no solamente nos han aportado sus muestras sanguíneas, si no también su tiempo, valioso tesoro.

Muchas gracias a todos.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a las siguientes becas y ayudas que han aportado financiación total o parcial para los estudios presentados:

- Beca PI 10/ 02407 del Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.
- Becas PI 11/00585 y PI 12/00204 del Fondo Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.
- ISCIII RETIC REDINREN RD 16/0009 FEDER FUNDS de la Unión Europea.
- BECA MUTUA MADRILEÑA (España).
- GRANT FROM GIOVANNI RANDI S.P.A. (Italy)

ABREVIATURAS

- VHC: Virus de la hepatitis C.
- CMSP: Células mononucleares en sangre periférica.
- ERC: Enfermedad renal crónica.
- GNIM: Glomerulonefritis inmuno-mediada.
- NGH: Nefropatía glomerular hereditaria.
- ND: Nefropatía diabética.
- RI: Resistencia insulínica.
- IAM: Infarto agudo de miocardio.
- ACVA: Accidente cerebro-vascular agudo.
- TR: Trasplante renal.
- RA: Rechazo agudo.
- INF: Interferón.
- INF-PEG: Interferón pegilado.
- RBV: Ribavirina.
- AAD: Antivirales de acción directa.
- RVS: Respuesta viral sostenida.
- DM: Diabetes mellitus.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ALT: alanina aminotransferasa.
- AST: aspartato aminotransferasa.
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa
- IMC: Índice de masa corporal.
- FG: Filtrado glomerular.
- IC: Intervalo de confianza.
- DS: desviación standart.
- FDA: Food and Drug Administration.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- KDIGO: Kidney Disease Global Outcomes.
- DOPPS: Dialysis Outcomes and Practice Patterns

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	11
INTRODUCCIÓN GENERAL A LA TESIS DOCTORAL.....	14
CAPÍTULO 1 – Introducción General a la problemática del Virus de la Hepatitis C en las enfermedades renales.	
1. Antecedentes.....	15
1.1. Algunos datos epidemiológicos.....	15
1.2. Infección por el virus de la hepatitis C.....	16
1.2.1. Breve cronología.....	16
1.2.2. Descripción del virus.....	17
1.2.3. Diagnostico del VHC mediante técnicas convencionales.....	17
1.2.4. Manifestaciones clínicas.....	18
1.2.4.1 Hepáticas y extrahepáticas.....	18
1.2.4.1.1. Renales.....	18
1.2.4.1.2. Virus de la hepatitis C y diabetes mellitus.....	19
1.2.4.1.3. Neoplasias.....	20
1.3. Enfermedad renal crónica.....	20
1.3.1. Definición y clasificación.....	20
1.3.1.1. Filtrado glomerular, albuminuria y proteinuria.....	20
1.3.2. Enfermedad renal crónica y diabetes mellitus.....	21
1.3.3. Enfermedad renal crónica y virus de la hepatitis C.....	22
1.3.3.1. Progresión de la enfermedad renal crónica y VHC.....	22
1.3.3.2. Supervivencia en hemodiálisis vs trasplante renal.....	22
1.3.4. Trasplante renal e infección por el virus de la hepatitis C.....	23

1.3.4.1. Medicación inmunosupresora y virus de la hepatitis C.....	23
1.3.4.2. Complicaciones del virus de la hepatitis C en el trasplante renal.	24
1.3.4.2.1. Afectación hepática.....	24
1.3.4.2.2. Rechazo agudo.....	25
1.3.4.2.3. Infecciones secundarias.....	25
1.3.4.2.4. Neoplasia extrahepática.....	25
1.3.4.2.5. Diabetes post-trasplante renal.....	26
1.3.4.2.6. Enfermedad renal post- trasplante renal.....	26
1.3.4.3. Efecto de la infección por el VHC en la supervivencia.....	27
1.3.4.3.1. Supervivencia del injerto.....	27
1.3.4.3.2. Supervivencia del paciente.....	27
1.4. Tratamiento antiviral.....	28
1.4.1. Interferón y ribavirina.....	28
1.4.2. Antivirales de acción directa.....	28
1.4.3. Momento del tratamiento antiviral.....	30
1.5. Donación de órganos.....	31
1.5.1. Donación VHC+ a receptor VHC+.....	32
1.5.2. Donación VHC + a receptor VHC.....	32
1.6. Infección oculta por el VHC.....	33
1.6.1. Diagnóstico.....	33
1.6.2. Tipos.....	33
1.6.3. Poblaciones.....	34
1.6.3.1. Donantes de sangre.....	34
1.6.3.2. Hemodiálisis y trasplante renal.....	34
1.6.3.3. Trastornos hematológicos.....	35
1.6.4. Tratamiento antiviral de la infección por el VHC oculto.....	35
1.6.5. Reactivación y resistencia al tratamiento antiviral.....	36
1.7 Bibliografía.....	37

CAPÍTULO 2. Justificación, hipótesis, objetivos y presentación de estudios.....	50
2.1. Justificación e hipótesis.....	50
2.2. Objetivos.....	50
2.3. Pacientes y métodos.....	52
CAPÍTULO 3. Glomerulonefritis e infección oculta por el VHC.....	56
CAPÍTULO 4. Diabetes Mellitus e infección oculta por el VHC.....	70
CAPÍTULO 5. Trasplante renal e infección oculta por el VHC.....	83
CAPÍTULO 6. Respuesta al tratamiento en receptores de Trasplante Renal tratados con antivirales.....	95
CAPÍTULO 7. Discusión general y conclusiones.....	108
ANEXOS: Comunicaciones en congresos y publicaciones.....	113

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- CAPÍTULO 1:
 - Figura 1: Relación entre el VHC y DM.
 - Tabla 1: Estadificación de la ERC según la guía KDIGO 2012.
 - Figura 2: Relación entre ERC y VHC.
 - Figura 3: Complicaciones asociadas al VHC en el TR.
 - Tabla 2: Progresión del tratamiento antiviral y su relación con la RVS.
 - Tabla 3: Recomendaciones de regímenes terapéuticos de antivirales de acción directa para pacientes con enfermedad renal crónica estadios G4 y G5D y trasplantados renales, según el genotipo del virus de la hepatitis C.
 - Figura 4: Consideraciones sobre el inicio del tratamiento antiviral: pre o post-TR.
- CAPÍTULO 3:
 - Tabla 1: Características clínicas y demográficas de los 113 pacientes.
 - Tabla 2: Parámetros demográficos y clínicos de los dos grupos de pacientes.
 - Tabla 3: Prevalencia de la infección oculta por el VHC dependiendo del tipo de glomerulonefritis.
 - Tabla 4: Comparación de pacientes con y sin infección por el VHC oculto en las GNIM.
 - Figura 1: Árbol filogenético construido mediante secuencias de nucleótidos del core del virus de la hepatitis C aislados mediante células mononucleares de sangre periférica de siete pacientes seleccionados al azar , designados mediante "P" , y procedentes del suero tras ultracentrifugación de dos pacientes diferentes designados mediante "S" (GenBank accession numbers KF889406-KF889432) en aquellos que corresponde a genotipos 1,2 y 3 del virus de la hepatitis C. Valores de Bootstrap ≥ 70 obtenidos después de 1000 replicaciones de los datos se muestran en los nodos del árbol.
- CAPÍTULO 4:
 - Tabla 1: Características demográficas y clínicas en el momento de la inclusión.
 - Tabla 2: Parámetros demográficos, clínicos y analíticos dependiendo de la infección por VHC oculto positivo/negativo.
 - Tabla 3: Parámetros de laboratorio renales y hepáticos al final del seguimiento dependiendo de la infección por VHC oculto positivo/negativo.
 - Figura 1: Evolución de la función renal en pacientes según VHC oculto positivo/negativo. (A) Niveles de creatinina plasmática inicial y final (mg/dl). (B) Aclaramiento de creatinina inicial y final (ml/min 1,73 m²).

- CAPÍTULO 5:
- Tabla 1: Parámetros demográficos, clínicos y analíticos de los pacientes en el momento del estudio.
- Tabla 2: Inmunosupresión según infección del VHC oculto positivo/negativo.
- Tabla 3: Complicaciones clínicas post-TR dependiendo del VHC oculto positivo/negativo.
- Figura 1A: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia del injerto renal dependiendo de la presencia de infección por el VHC oculto. (Meses).
- Figura 1B: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia del paciente dependiendo de la presencia de la infección por el VHC oculto. (Años).
- CAPÍTULO 6:
- Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los 18 pacientes.
- Tabla 2: Características de los 14 receptores de TR tratados con AAD.
- Tabla 3: Parámetros hepáticos y renales pre y post tratamiento antiviral.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL A LA TESIS DOCTORAL

Este trabajo reúne cuatro estudios independientes distribuidos en cuatro capítulos diferentes. En conjunto del trabajo nos introduce en el estudio epidemiológico de la infección oculta por el VHC en una población de pacientes con enfermedad renal crónica centrándose en tres grupos según su diagnóstico (glomerulopatías, ND) y un tercer grupo de trasplantados renales. En cada grupo además de establecer la prevalencia y posibles formas de transmisión del VHC, trata de determinar las implicaciones clínicas que la infección oculta por el VHC pueda tener. Incluimos un cuarto grupo de pacientes VHC positivos tratados con antivirales que alcanzaron la RVS en los que quisimos comprobar la eficacia, seguridad y repercusión clínica (hepática y renal), del tratamiento antiviral. Dado que el mayor número de pacientes tratados en nuestro servicio se encontraba dentro del grupo de trasplantados renales, lo decidimos realizar en este grupo, dada la baja prevalencia de anti VHC positivos tratados, en enfermos con nefropatías glomerulares o diabética.

La Tesis Doctoral se inicia con una introducción general que ofrece una perspectiva global de los aspectos más relevantes que abarca el estudio y las controversias vigentes en torno al VHC. Posteriormente, se describen la justificación, hipótesis, objetivos y metodología del estudio. A continuación, se presentan los cuatro estudios de investigación; los tres primeros de carácter prospectivo, y el último retrospectivo. Finalmente, se realizan una discusión y conclusiones generales.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL A LA PROBLEMÁTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LAS ENFERMEDADES RENALES

1. Antecedentes

1.1. Algunos datos epidemiológicos

Prevalencia del virus de la Hepatitis C:

La infección por el VHC según una reciente revisión sistemática afecta a aproximadamente 185 millones de personas en el mundo. (1) En países desarrollados entre los años 2008 y 2010 va desde el 1,8% al 8,0%. (2) En España afecta a unas 200000 personas, con una prevalencia por anti- VHC de 1,7% (0,4%-2,6%), siendo el genotipo 1b el más frecuente (43,8%), seguido del 1a (25,5%) y 3 (19,6%). (3)

Prevalencia de Enfermedad Renal Crónica:

En países desarrollados, se ha descrito una prevalencia media de ERC del 7,2% (individuos mayores de 30 años). (4)

Según datos del estudio EPIRCE afecta aproximadamente al 10% de la población adulta española y a más del 20% de los mayores de 60 años y además está seguramente infradiagnosticada. (5)

Prevalencia del virus de la Hepatitis C y Enfermedad Renal Crónica:

Molnar et al describieron una prevalencia del 11,2% en una cohorte de 100000 veteranos americanos. (6) Según el estudio DOPPS, la prevalencia de infección por VHC en unidades de diálisis españolas se estimó en un 22,2 % con una tasa de seroconversión de 3,5 por 100 pacientes-años (entre 1997 y 2001) y aumentaba con el tiempo en diálisis, superando el 20% a los 10 años. (7) Estudios posteriores en pacientes con ERC en España estimaron la prevalencia en torno al 5-6%. (8)

La prevalencia de la infección por el VHC en receptores de TR en España ha disminuido del 29,5% en 1990 al 10% en 1998. (9) La variación en la prevalencia depende de varios factores, que incluyen el medio donde el paciente se trata, la etnia, área geográfica, el tipo y la duración de la diálisis, el número de trasplantes, la reactividad frente al antígeno del core del virus de la hepatitis b y la frecuencia de administración de drogas intravenosas.

La mayoría de los receptores de TR adquieren la infección del VHC a través del tratamiento dialítico, y con menos frecuencia por transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos. (10)

Prevalencia de Diabetes Mellitus y Nefropatía diabética:

- Incidencia en 2014 de diabetes en el mundo: 422 millones de personas. (11)
- Según los casos del Registro de diálisis y trasplante de la Sociedad Española de Nefrología de 2006, la ND fue la causa de inicio de tratamiento renal sustitutivo del 24% de los casos, con tendencia ascendente, y muy por encima del 16% de causas vasculares y del 14% de glomerulonefritis primarias. En EEUU, el porcentaje es todavía mayor, siendo en torno al 50%, considerándose actualmente a la DM tipo 2 como la principal causa de inicio de tratamiento renal sustitutivo en la mayoría de los países desarrollados.

1.2. Infección por el virus de la Hepatitis C

1.2.1. Breve cronología

- 1989: Descubrimiento del VHC.
La existencia del VHC se puso de manifiesto después del descubrimiento de los virus de la hepatitis A y B a finales de la década de 1960 y principios de la década de 1970 ya que una gran proporción de los casos de hepatitis aguda y crónica no podían ser explicados por ninguno de estos agentes. Se sospechó otro agente viral, y se propuso que los pacientes infectados con este agente sospechoso tenían hepatitis no A, no B. El agente finalmente se identificó cuando se clonó el genoma del virus y se designó VHC. (12).
- Principios década de 90s: Inicio de detección anti-VHC en donantes de sangre.
- 1990: Descripción del primer caso de VHC y crioglobulinemia.
- 1993: Descripción de 8 casos de glomerulonefritis membranoproliferativa asociada a la infección por el VHC. (13)
- 2004: Se describió la infección oculta por el VHC. (14).
- 2011: Aprobados por la FDA la primera generación de AAD: telaprevir y boceprevir.
- 2013: Aparecieron nuevos anti-AAD, mejor tolerados, y con menor perfil de efectos adversos.
- 2014: La infección por el VHC afecta a aproximadamente 185 millones de personas en el mundo. (15).
- 2015-2016: A nivel mundial el número de personas que iniciaron el tratamiento basado en AAD aumentó de aproximadamente 1 millón a 1,5 millones.
- 2016: Inicio del tratamiento de TR con AAD.
- 2017: 72.000 pacientes elegibles que tienen fibrosis de leve a grave habían recibido tratamiento en España contra el VHC de forma gratuita. (16).

- 2030: Fecha objetivo de la OMS para la erradicación del VHC. (17).

1.2.2. Descripción del VHC

El virus de la VHC, pertenece al género Hepacivirus dentro de la familia de Flaviviridae. Es pequeño, mide entre 55-65nm. Su genoma es un ARN de polaridad positiva (cadena genómica) que se replica mediante la síntesis de una cadena de ARN complementaria de polaridad negativa, llamada cadena antigenómica. Posee una gran variabilidad genética gracias a la alta tasa de error de replicación y a la alta producción de partículas virales, existiendo 7 genotipos y 67 subtipos.

Los genotipos 1a y 1b son los más prevalentes en Europa Occidental y Estados Unidos, seguidos de los genotipos 2 y 3. El genotipo 4 está extendido en Egipto y el 6 en el Sudeste Asiático. (18). En pacientes procedentes de Canadá y Bélgica se ha descrito un séptimo genotipo. (19).

Durante el ciclo replicativo del virus se sintetizan las diferentes proteínas estructurales (core o nucleocápside y envuelta) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B; NS5A y NS5B), que poseen diversas funciones frente a las cuales se desarrollan anticuerpos específicos. Las proteínas no estructurales son importantes como diana en el tratamiento de los nuevos AAD.

1.2.3. Diagnóstico del VHC mediante técnicas convencionales

Anticuerpos frente al VHC: La detección de anticuerpos frente al VHC en una muestra de suero o plasma aporta la evidencia de exposición al VHC y constituye la base del diagnóstico serológico de la infección. Indica exposición o contacto previo con el virus. Si los anticuerpos anti VHC son positivos, para confirmar la infección crónica se necesita una prueba que detecte el ARN del virus. La sensibilidad es cercana al 100% en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, existe un “periodo ventana” entre la infección activa y el desarrollo de anticuerpos específicos, de unas 8 semanas y en pacientes inmunodeprimidos la producción de anticuerpos puede estar ausente, o la seroconversión puede ser tardía o transitoria. Si hay datos diagnósticos y/o clínicos que hagan sospechar una infección por VHC debe repetirse la prueba serológica anti-VHC, incluso se debe solicitar un análisis de ARN-VHC en suero.

ARN del VHC: Su detección indica replicación viral, por lo que es el marcador que se utiliza para diagnosticar infección activa y establecer la curación de la enfermedad tras el tratamiento antiviral.

Antígeno core del VHC: Al igual que el ARN del VHC su detección implica replicación viral. Presenta una menor sensibilidad que el ARN del VHC para la detección de

viremias bajas (hasta un 1 % puede no detectarse el Ag). Diversos estudios han puesto de manifiesto su utilidad para la identificación de pacientes con infección activa por VHC. Su determinación es más barata que el ARN-VHC.

Genotipo: Además, se debería realizar identificación del genotipo ya que el daño hepático y el genotipo del virus se utilizan para orientar las decisiones terapéuticas y la conducta clínica. La reciente aparición de regímenes pangénóticos hace necesario replantear si esta determinación es necesaria en la mayoría de los pacientes, aunque sigue existiendo un papel importante en los casos de fallo terapéutico, para definir una potencial reinfección, y para llevar a cabo las sustituciones terapéuticas asociadas a resistencia. (20).

1.2.4. Manifestaciones clínicas del virus de la Hepatitis C

1.2.4.1. Manifestaciones hepáticas y extrahepáticas

Como virus hepatotrofo, la infección por el VHC principalmente afecta el hígado; sin embargo, se estima que el 40-74% de los pacientes con hepatitis crónica por VHC pueden desarrollar al menos una manifestación extrahepática durante el curso de la enfermedad. Los síndromes extrahepáticos pueden representar la primera señal de infección por hepatitis C en algunos pacientes.

La hepatitis crónica por VHC se ha relacionado con afectación renal (35-60%), con RI y DM tipo 2; con enfermedad cardiovascular en 17-37% de los pacientes; y con un mayor riesgo de muertes cerebrovasculares. También se ha asociado con trastornos linfoproliferativos, particularmente linfoma de células B no-Hodgkin y otros trastornos hematológicos, entre otras manifestaciones.

Por lo tanto, las manifestaciones extra-hepáticas de VHC implican sistemas de órganos múltiples fuera del hígado vinculados a una variedad de comorbilidades que pueden conducir a un aumento significativo de la mortalidad por eventos no relacionados con el hígado. (21)

1.2.4.1.1. Renales

El tipo predominante de afectación renal asociada es la glomerulonefritis membranoproliferativa con o sin crioglobulinemia. En el 30% de los casos, el compromiso renal comienza con un síndrome nefrítico e insuficiencia renal aguda, mientras que en el 55% solo hay hematuria leve, microalbuminuria, proteinuria e insuficiencia renal. Se han descrito un amplio espectro de enfermedades renales glomerulares en pacientes infectados por el VHC. (22-25).

Existe evidencia del impacto directo de la infección del VHC en la patogenia de las

glomerulonefritis asociadas al VHC, que se ha relacionado con el depósito de inmunocomplejos que contienen ARN- VHC en el glomérulo. Estos inmunocomplejos activan el *Toll-like receptor 3* que promueve la liberación de citocinas y chemokinas inhibiendo la proliferación y estimulando la apoptosis de las células mesangiales. (26).

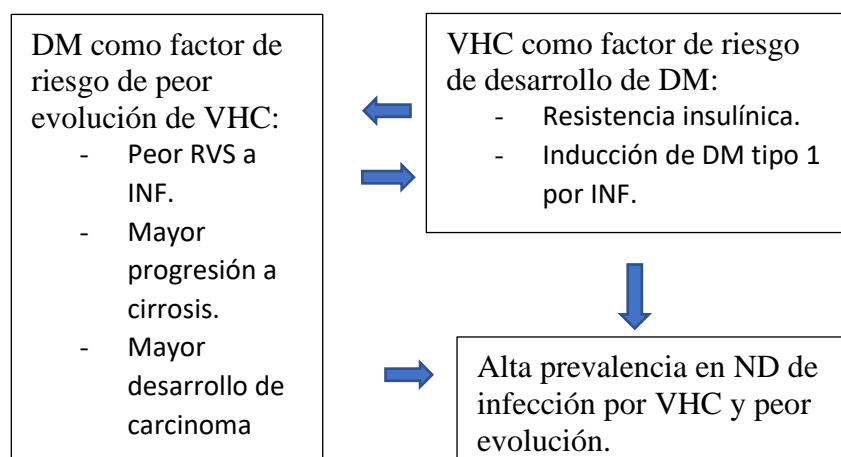
1.2.4.1.2. Virus de la hepatitis C y diabetes mellitus

La relación entre la DM y el VHC es controvertida. Estudios epidemiológicos, incluyendo dos metanálisis, (27- 28), estudios longitudinales posteriores y la descripción de mecanismos fisiopatológicos por los que la infección puede causar o exacerbar la RI sugieren la asociación entre el VHC y DM. Se estima que hasta el 50% de los pacientes con infección crónica por VHC, presentan algún tipo de anomalía en el metabolismo de la glucosa. (29) Además, comparten la esteatosis hepática, la inflamación subclínica y quizás incluso la enfermedad cardiovascular, que producen un considerable aumento de la morbi-mortalidad prematura. (30).

Recientemente, Ruhl et al. revisaron la asociación de infección por VHC y prediabetes o DM tipo 2 en una cohorte de 15128 pacientes americanos (NHANES). Constaron que la prevalencia de diabetes o prediabetes no estaba asociada con el status de infección por VHC. (31).

La DM puede ser un factor de riesgo para la peor evolución del VHC, y, por otro lado, el VHC puede serlo también para el desarrollo de DM. Ambos pueden causar afectación renal que puede llevar a ERC terminal que requiera diálisis o TR.

Figura 1: Relación entre VHC y DM.



1.2.4.1.3. Neoplasia

Aunque la asociación con carcinoma hepatocelular es la más descrita asociada al VHC, también se ha descrito su relación con linfoma, especialmente con linfoma no-Hodgkin difuso de células B. Aunque los mecanismos no son bien conocidos se ha descrito regresión del tumor con tratamiento antiviral. (32). En un metanálisis reciente realizado por Yuying Li, el VHC aumentó el riesgo de mieloma múltiple en países con alta prevalencia de VHC. (33). También se ha descrito la asociación con carcinoma de próstata, tiroides y mama. (34-37).

1.3. Enfermedad renal crónica

1.3.1. Definición y clasificación

La ERC es un problema de salud pública importante. (38-39). En el adulto se define como la presencia de una alteración estructural funcional renal (sedimento, imagen, histología) que persiste más de 3 meses con o sin deterioro de la función renal; o un FG < 60 ml/min/1,73m² sin otros signos de enfermedad renal. Las guías KDIGO han incluido los trasplantes renales independientemente del grado de fallo renal que presenten. La gravedad de la de ERC se ha clasificado en 5 categorías o grados según el FG y 3 categorías de albuminuria.

Tabla 1: Estadificación de la ERC según la guía KDIGO 2018. (40)

Pronóstico de la ERC según FGe y albuminuria: KDIGO 2012				Categorías por albuminuria, descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal o aumento leve < 30 mg/g < 30 mg/mmol	Aumento moderado 20-299 mg/g 3-29 mg/mmol	Aumento grave ≥ 300 mg/g ≥ 30 mg/mmol
Categorías por FGe, descripción y rango (ml/min/1,73 m ²)	G1	Norma o alto	> 90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado-grave	30-44			
	G4	Descenso grave	15-29			
	G5	Fallo renal	< 15			

1.3.1.1. Filtrado glomerular, albuminuria y proteinuria

Medición del Filtrado Glomerular:

El FG es un parámetro crítico, para el estadiaje, manejo y seguimiento. La creatinina sérica comienza a aumentar cuando el FG desciende un 50%. El Clcr es el parámetro más difundido para la medición del FG, pero conlleva el potencial error en la recogida

de la orina de 24 horas. Se han desarrollado fórmulas para el cálculo del FG a partir de la creatinina sérica junto a variables analíticas, demográficas y antropométricas obviando la necesidad de recogida de la orina de 24 horas. Las más empleadas en la investigación y práctica clínica son el MDRD y el CKD-EPI, que ha demostrado mejores resultados en cuanto a exactitud y precisión. (41).

Albuminuria y proteinuria:

Albuminuria: su rango de excreción se extiende entre 30 y 300 mg/24horas y se conoce como microalbuminuria. Estos límites comprenden el rango que va desde el límite superior de la excreción urinaria hasta el nivel de detectabilidad inequívoca de las tiras detectoras de proteinuria. Si la albuminuria persiste mas de tres meses es un factor de riesgo de deterioro de función renal progresivo, así como de eventos cardiovasculares adversos.

La proteinuria en orina de 24 horas se considera el patrón de oro, pero es difícil garantizar la recogida correcta. La determinación simultánea de la creatinina urinaria permite establecer el cociente albumina o proteína/Cr, que presenta una buena correlación con la eliminación en 24 horas.

La proteinuria es el factor de riesgo modificable más potente de progresión de ERC e influye directamente en el pronóstico y en la toma de decisiones clínicas. Por todo ello, la medición del FG y la determinación de la proteinuria, son herramientas clave para el diagnóstico y manejo de la ERC. (42).

1.3.2. Enfermedad renal crónica y diabetes mellitus

La DM tipo 2 es la principal causa de ERC en nuestro medio y constituye una importante comorbilidad de la nefropatía no diabética. (43).

La ND es una de las principales complicaciones microvasculares de la DM. La patogenia es multifactorial, ya que no solo intervienen alteraciones metabólicas y hemodinámicas favorecidas por la hiperglucemia, sino que hay un claro condicionante genético que explicaría la mayor predisposición al desarrollo de ND en unos diabéticos respecto a otros. Se distinguen 5 fases que van desde la hiperfiltración glomerular hasta la ERC terminal. Los costes del tratamiento de la ND son extremadamente altos, debido en parte a la relación entre ND y riesgo cardiovascular, el desarrollo de ERC terminal y la necesidad de tratamiento multidisciplinar. (44). En los pacientes con ND existe una alta prevalencia de marcadores de infección convencional por VHC (19,5%). (45-46). La presencia de infección por el VHC se ha descrito que aumenta la progresión de la ND. (47).

1.3.3. Enfermedad renal crónica y virus de la hepatitis C

El VHC es la infección viral que se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con ERC. (48). El VHC puede causar afectación glomerular que puede llevar a ERC terminal que requiera diálisis o trasplante. Por otro lado, la propia ERC puede favorecer la adquisición del VHC, lo que puede explicar la elevada prevalencia de VHC en ERC. (49).

Figura 2: Relación virus de la hepatitis C y Enfermedad renal crónica.

VHC como causa de ERC:

- El VHC se ha asociado con enfermedades renales glomerulares.
- Los pacientes con ERC y VHC, progresan más rápidamente a ERC terminal.
- Estudios poblacionales han encontrado una asociación entre positividad para el VHC y marcadores de ERC como albuminuria.

VHC como consecuencia de ERC:

- Transfusiones sanguíneas.
- Transmisión nosocomial en unidades de diálisis.
- Transmisión por injertos renales.

Mayor prevalencia de VHC en ERC que en la población general.

Proteinuria y virus de la hepatitis C:

Johnson and col. describieron que la proteinuria se disminuía significativamente cuando los pacientes con infección por VHC y disfunción renal se trataban con interferón α . (50). La remisión de la proteinuria estaba asociada con la supresión de la viremia, durante el tratamiento, y la discontinuación del mismo, estaba asociado con recurrencia de ambos, viremia y proteinuria. Otro estudio, ha confirmado los mismos resultados sugiriendo una relación directa entre infección por VHC y ERC. (51).

1.3.3.1. Progresión de la enfermedad renal crónica y virus de la Hepatitis C

Molnar et al. describieron que la infección por el VHC se asoció con un riesgo aumentado de mortalidad, incidencia y progresión de enfermedad renal. (52)

1.3.3.2. Supervivencia

En pacientes VHC+ con TR a pesar del mayor riesgo de infecciones, DM post-TR, enfermedad cardiovascular y fibrosis respecto a pacientes con TR sin el VHC clásico, su supervivencia es mayor cuando se compara a la de pacientes en hemodiálisis. (53).

Posteriores estudios han confirmado el riesgo de los pacientes en diálisis con VHC. (54,55).

Una de las principales causas de muerte en la lista de espera fueron las enfermedades cardiovasculares, mientras que la infección fue una causa importante en el grupo de TR. (56).

1.3.4. Trasplante renal e infección por virus de la hepatitis C

La infección por el VHC, sin embargo, es un **factor predictivo de mal pronóstico** en receptores de TR, incrementando la morbilidad y la mortalidad en estos pacientes debido al agravamiento de la enfermedad hepática, al mayor riesgo de infecciones, y al desarrollo de DM post-TR o enfermedades glomerulares (57). incluyendo la NCI (58-61).

En las Guías KDIGO de 2018 se recomienda el trasplante renal como la mejor opción terapéutica para pacientes con enfermedad renal crónica estadio G5 independientemente de la presencia de infección por el virus de la hepatitis C. (62).

1.3.4.1. Medicación inmunosupresora e infección por VHC

En presencia de infección por VHC la inmunosupresión tiene consecuencias significativas sobre la replicación y la enfermedad producida por el VHC. El régimen inmunosupresor más apropiado en receptores de TR con infección por el VHC es **objeto de controversia**.

Existen resultados contradictorios en cuanto a los efectos peligrosos o beneficiosos de los inmunosupresores de inducción en el curso de la infección por el VHC y la supervivencia del injerto renal. (63-64).

Los corticoides se han asociado con una mayor replicación del VHC (65), sin embargo, Luan et al. demostraron diferencias significativas en la mortalidad entre los pacientes que recibieron esteroides y los que no lo hicieron. (66). Akalin et al. señaló que la rápida interrupción del tratamiento con esteroides no estaba asociado con peores resultados en receptores de TR VHC positivo. (67).

Kahraman et al. investigó los receptores de TR con VHC, y observaron diferencias significativas entre un grupo que recibió tacrolimus y un grupo que había recibido ciclosporina con respecto a la replicación viral y desarrollo de la fibrosis hepática, ya que la ciclosporina podría inhibir la replicación del VHC. (68-70).

El micofenolato mofetil se sabe que tiene efectos antivirales en pacientes con VHC, y actúa mediante la inducción de la expresión de los genes de IFN- alfa (71-72).

Inhibidores de mTOR: Hay escasos datos sobre la influencia de sirolimus y everolimus

en los receptores de TR con el VHC. (73). Luan et al. encontró que los inhibidores de mTOR estaban asociados con 13% mayor riesgo de mortalidad en este grupo de pacientes (74). Estos medicamentos no se recomiendan como régimen estándar para los receptores de TR con VHC. (75).

1.3.4.2. Complicaciones del virus de la hepatitis C en el Trasplante Renal

Las principales complicaciones clínica de la infección por el virus de la hepatitis C en el post-trasplante renal se encuentran recogidas en la figura 3.

Figura 3: Complicaciones clínicas de la infección por VHC en el post-TR. (Los asteriscos indican el grado de asociación: (*) Débil; (**) Moderado; (***) Fuerte).

Complicaciones hepáticas: (***)	Complicaciones extrahepáticas:
- Hepatitis crónica.	- GN de novo o recurrente (***)
- Fibrosis hepática.	- Glomerulopatía del TR. (***)
- Cirrosis.	- DM post-TR. (**)
- Enfermedad hepática terminal.	- RA. (*)
- Hepatitis colestásica fibrosante	- Infecciones. (*)
- Carcinoma hepatocelular.	- Malignidad (*)

1.3.4.2.1. Afectación hepática

La infección por el VHC tras el TR generalmente progresa sin complicaciones inmediatas aunque las manifestaciones clínicas y alteraciones patológicas pueden ir progresando con el tiempo. La hepatitis colestásica fibrosante solamente aparece en el 1,5 % de los pacientes. Solamente un 20-51% de los pacientes con infección por el VHC, tienen alterada la función hepática, a pesar de presentar ARN-VHC positivo en suero. Estos hallazgos no implican histología hepática normal. El riesgo de desarrollar infección hepática crónica determinado como elevación de transaminasas >6 meses, depende de la severidad de la afectación hepática pre-TR, la infección concomitante por el VHB, el tiempo post-TR y el régimen inmunosupresor. La mortalidad debida a enfermedad hepática está aumentada en los pacientes con infección por el VHC, en comparación con aquellos sin infección por el VHC. Solo un porcentaje pequeño de pacientes requerirá un trasplante hepático a medio plazo. (75).

1.3.4.2.2. Rechazo agudo

El efecto de la infección por VHC sobre el riesgo de RA del injerto renal **es controvertido**. Aunque la infección por el VHC produce una reducción en los linfocitos T *-helper* y una alteración en la respuesta proliferativa frente a mitógenos, y estas alteraciones apoyarían la disminución de la incidencia de RA, la tasa de RA se ha estimado en un 14,5% y confirmado posteriormente en otras series. Para clarificar si la infección por el VHC es un factor de riesgo para el rechazo mediado por anticuerpos, es fundamental realizar un ajuste para los anticuerpos reactivos a panel. Tras este ajuste Forman et al encontraron que la infección por el VHC no era un factor de riesgo independiente para el desarrollo de RA mediado por anticuerpos. (76).

El tiempo en diálisis, los trasplantes previos y el número de transfusiones son factores de riesgo para el desarrollo de RA e infección por VHC.

1.3.4.2.3. Infecciones secundarias

Los receptores de trasplantes de órganos infectados por el VHC tienen mayor riesgo de infecciones con riesgo vital en comparación con aquellos sin infección del VHC. Probablemente sean debidas a la inmunodeficiencia que confiere la infección por el VHC. Estas infecciones pueden afectar al sistema nervioso central, los pulmones y producir bacteriemias post-cirugía. (77-79). Además, la infección por el VHC ha demostrado ser un factor de riesgo independiente para la septicemia y la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. (80). El riesgo es máximo en los primeros 6 meses post-TR, ya que es en este periodo cuando el efecto inmunosupresor es mayor, debido a la medicación inmunosupresora.

1.3.4.2.4. Neoplasia extrahepática

La enfermedad linfoproliferativa post-trasplante y el mieloma se han asociado con la infección por el VHC. (81). Datos preliminares de Australia y Nueva Zelanda han mostrado que la tercera causa de muerte en pacientes con infección por el VHC es la neoplasia. Se ha demostrado un efecto directo de la infección por el VHC en la carcinogénesis de las células linfoides. (82-84). Aunque estos datos deben ser confirmados, sugieren que la infección por el VHC puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad linfoproliferativa post-TR y otras enfermedades hematológicas.

1.3.4.2.5. Diabetes post-trasplante renal

La DM post-trasplante es una complicación que ocurre en receptores de TR en un 6-19%. (85). Las drogas inmunosupresoras, especialmente, los corticoides, el tacrolimus y la ciclosporina son los supuestos responsables de esta complicación. (86). La evidencia también sugiere una mayor prevalencia de DM post-trasplante en pacientes que recibieron un trasplante siendo positivos por serología para la infección por VHC. Además, la tasa de mortalidad en este grupo incluyendo la mortalidad por IAM fue más prevalente. (87).

Distintos grupos han sugerido mecanismos patogénicos que explicarían el desarrollo de DM en receptores VHC positivos de TR.

1.3.4.2.6. Enfermedad renal post- trasplante renal inducida por la infección del VHC

1.3.4.2.6.1. Glomerulonefritis *de novo* y recurrente

Se han descrito la aparición de glomerulonefritis de novo y la recurrencia en el injerto renal de distintas enfermedades renales en pacientes infectados por el VHC. La lesión más frecuente es la glomerulonefritis membranoproliferativa, que generalmente ocurre tras trasplantes repetidos, seguida de la glomerulonefritis membranosa. También se ha descrito la microangiopatía trombótica asociada a anticuerpos anti-cardiolipina. (88-93). La afectación renal no se correlaciona con la severidad de la afectación hepática.

1.3.4.2.6.2. Glomerulopatía del trasplante renal

La prevalencia de anticuerpos anti VHC es superior en pacientes con glomerulopatía post-TR (33%) que en aquellos sin esta lesión (1,9%). (94). Este hallazgo ha sido posteriormente corroborado en otros estudios. (95-97). Baid- Agrawal estudió un grupo de trasplantados renales con glomerulopatía post- trasplante, y encontró la infección por el VHC, como una de las posibles etiologías, para su desarrollo. Esta asociación debe ser validada y determinado el riesgo inmunológico y el efecto directo de la infección por el VHC a nivel glomerular. (92).

1.3.4.3. Efecto de la infección por el virus de la Hepatitis C en la supervivencia

1.3.4.3.1. Supervivencia del injerto

Varios estudios, de carácter retrospectivo, han demostrado que los pacientes con infección por el VHC tienen una menor supervivencia del injerto que aquellos sin infección por el VHC, (98-99). Varias complicaciones asociadas al VHC parecen contribuir a esta menor supervivencia: el desarrollo de proteinuria debida a NCI, las glomerulonefritis asociadas a la infección por el VHC, la glomerulopatía del trasplante renal y la DM post-trasplante. Un estudio sobre supervivencia renal a 5 años ha demostrado que este parámetro era peor en pacientes infectados por el VHC, comparado con aquellos sin infección (HR 1,71). Las causas más frecuentes de pérdida renal, en estos pacientes fueron las glomerulonefritis (HR 2,71) y la NCI (HR 1,87). (100). Un meta-análisis mostró que la presencia de anticuerpos anti VHC era un factor de riesgo independiente para la pérdida del injerto. (101). Este hallazgo ha sido posteriormente confirmado en una revisión sistemática. (102).

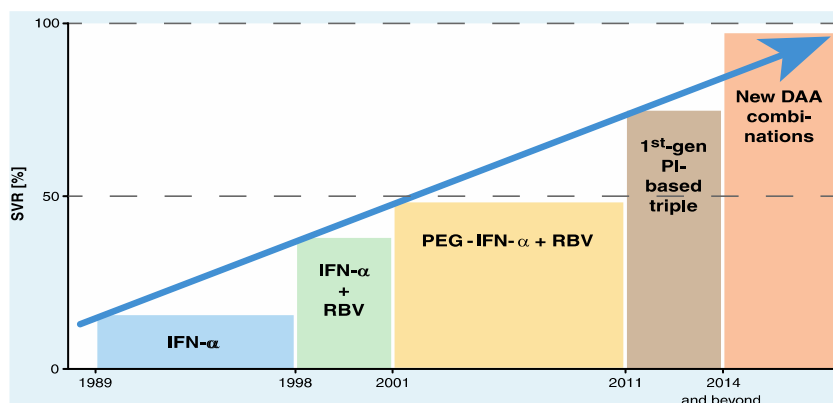
1.3.4.3.2. Supervivencia del paciente

La mayoría de los estudios con seguimiento a largo plazo, encontraron que la infección por el VHC es un factor de riesgo independiente para la supervivencia del paciente. Esto se ha confirmado posteriormente en 2 meta-análisis. (103-104). La enfermedad cardiovascular fue mas prevalente en aquellos receptores de TR VHC positivo, y la infección crónica por el VHC se ha identificado como factor de riesgo de aterosclerosis. (105).

1.4. Tratamiento antiviral

La figura 4, muestra la progresión del tratamiento antiviral y su relación con la RVS.

Figura 4: Progresión del tratamiento antiviral y su relación con la RVS.



DAA, direct-acting antiviral; IFN-alpha, interferon-alpha; PEG-IFN-a, pegylated interferon-alpha; 1st-gen PI, first-generation protease inhibitor; RBV, ribavirin; SVR, sustained virological response. Adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Immunol, Heim MH (105), 2013

1.4.1. Interferón y ribavirina

Las terapias antivirales convencionales no eliminaban el VHC de forma eficiente y segura. De hecho, las pautas de KDIGO 2008 para el tratamiento del VHC recomiendan el tratamiento del VHC solo en receptores de TR que tienen indicaciones urgentes para la terapia, como empeoramiento de la enfermedad hepática clínica e histológica. Por lo tanto, la mayoría de los receptores de TR con VHC no recibían tratamiento. El INF y la RBV eran las mejores opciones. Sin embargo, el interferón está asociado a escasa RVS (13-43%) y esta contraindicada en el post-TR debido a la alta prevalencia de efectos adversos, incluido el RA del injerto. La monoterapia con RBV no era eficaz.

1.4.2. Antivirales de acción directa

En 2011 la primera generación de anti AAD fueron aprobados por la FDA: telaprevir y boceprevir. La eficacia de estos inhibidores de la proteasa orales se evaluó en los estudios ADVANCE y SPRINT 2. (106-108). Su empleo estaba limitado en el post-TR debido a las interacciones con los inhibidores de la calcineurina y severos efectos adversos.

En 2013 aparecieron nuevos anti-AAD, mejor tolerados, y con menor perfil de efectos adversos. Su desarrollo ha revolucionado el campo del tratamiento del VHC en los últimos años. La curación del VHC parece estar presente en las etapas ERC 4-5, según

distintos estudios (C SURFER, TRIO, RUBY 1 y 2, EXPEDITION IV, HCV TARGET). (109-111).

Existen datos extremadamente limitados sobre el manejo del VHC en pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

En 2016 se describieron los primeros casos de tratamiento en TR con AAD.

Publicaciones recientes demuestran que las terapias AAD curaron eficazmente el VHC en 406 de 418 receptores de TR (97%); la mayoría fueron tratados con regímenes basados en sofosbuvir. Un número menor de receptores de TR ha sido tratado con paritaprevir-ritonavir, ombitasvir y dasabuvir, elbasvir-grazoprevir o glecaprevir-pibrentasvir con excelente éxito, tolerancia y seguridad.

En resumen, los AAD pueden utilizarse en el post-TR. Las interacciones son débiles, objetivándose en algunos pacientes disminución de niveles de anticalcineurínicos. Con monitorización cuidadosa la función renal permanece estable y los rechazos son poco frecuentes. (112-121).

Los últimos avances incluyen la aprobación de regímenes que pueden tratar a los pacientes con disfunción avanzada del injerto (FR <30 ml / min por 1.73 m²) y regímenes "pan-genotípicos" que tienen actividad contra los principales genotipos del VHC. (122).

En las Guías KDIGO 2018, se recomienda que todos los pacientes trasplantados renales infectados con el virus de la hepatitis C sean evaluados para recibir tratamiento antiviral. Se recomienda tratamiento con regímenes basados en antivirales de acción directa según la Tabla 3.

Tabla 3: Recomendaciones de regímenes terapéuticos de antivirales de acción directa para pacientes con enfermedad renal crónica estadios G4 y G5D y trasplantados renales, según el genotipo del virus de la hepatitis C. (123)

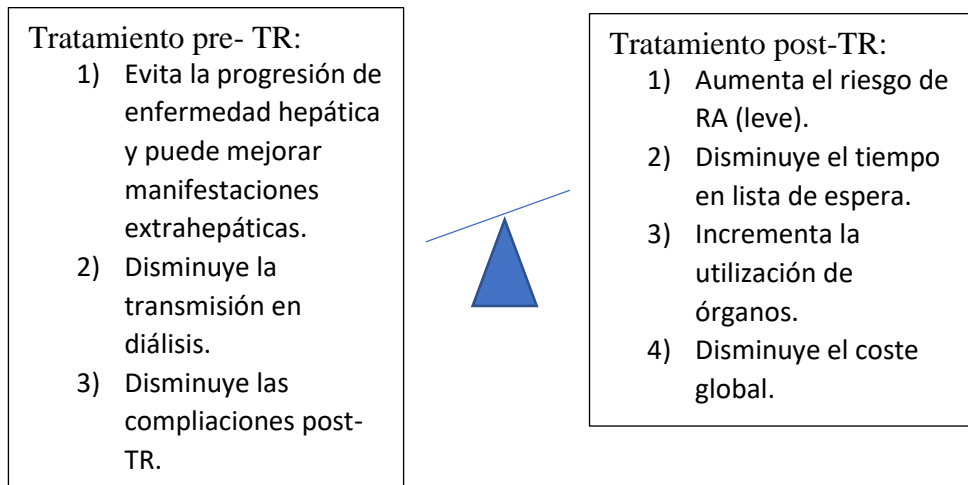
Kidney function	HCV genotype	Recommended regimen(s)	Strength of evidence	Alternate regimen(s)	Strength of evidence
CKD G4–G5 (GFR < 30 ml/min per 1.73 m ²) including HD, KTR ^b	1a	Grazoprevir/elbasvir	1B	Ritonavir-boosted paritaprevir, ombitasvir, and dasabuvir (also known as ProD or 3D regimen) with ribavirin	2D
		Glecaprevir/pibrentasvir	1B	Daclatasvir/asunaprevir	2C
	1b	Grazoprevir/elbasvir	1B	Ritonavir-boosted paritaprevir, ombitasvir, and dasabuvir (also known as ProD or 3D regimen)	2D
		Glecaprevir/pibrentasvir	1B	Daclatasvir/asunaprevir	2C
	2,3	Glecaprevir/pibrentasvir	1B		
	4	Grazoprevir/elbasvir	2D		
		Glecaprevir/pibrentasvir	1B		
5,6	Glecaprevir/pibrentasvir	2D			
CKD G5 PD	n/a (reasonable to follow proposed regimens for HD)				
KTR (GFR ≥ 30 ml/min per 1.73 m ²)	1a	Sofosbuvir with ledipasvir, daclatasvir or simeprevir	1B	Sofosbuvir/ribavirin	2D
		Glecaprevir/pibrentasvir ^c	1C		
	1b	Sofosbuvir with ledipasvir, daclatasvir or simeprevir	1B		
		Glecaprevir/pibrentasvir ^c	1C		
	2, 3, 5, 6	Glecaprevir/pibrentasvir ^c	1D	Sofosbuvir/daclatasvir/ribavirin ^d	2D
	4	Sofosbuvir with ledipasvir, daclatasvir or simeprevir	1D		
Glecaprevir/pibrentasvir ^c		1D			

Figure 1 | Recommended direct-acting antiviral (DAA) treatment regimens for patients with chronic kidney disease (CKD) G4–G5D and kidney transplant recipients (KTRs), by hepatitis C virus (HCV) genotype^a. Duration of therapy for all above regimens is usually 12 weeks but readers should consult Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) or European Association for the Study of the Liver guidelines for latest guidance.^aWe recommend that CKD patients with glomerular filtration rates (GFRs) ≥ 30 ml/min per 1.73 m² (CKD G1T–G3bT) be treated with any licensed DAA regimen.^bThere is little published evidence to guide treatment regimens in KTRs with GFR < 30 ml/min per 1.73 m² (CKD G4T–G5T). Regimens in KTRs should be selected to avoid drug–drug interactions, particularly with calcineurin inhibitors.^cBased on Reau *et al.*³ ^dAs suggested in AASLD guidelines (<https://www.hcvguidelines.org/>). CKD G, chronic kidney disease (GFR category); HD, hemodialysis; n/a, no data or evidence available; PD, peritoneal dialysis.

1.4.3. Momento del tratamiento antiviral

Actualmente, se recomienda que todas las decisiones sobre el momento de inicio del tratamiento antiviral para los pacientes en la lista de espera de TR se debatan con su centro de trasplante y la decisión se tome caso por caso, teniendo en cuenta los beneficios potenciales de erradicar el VHC lo antes posible, al tiempo que se reconoce que el acceso a los riñones de donantes fallecidos infectados por el VHC reduciría significativamente el tiempo de diálisis. (125).

Figura 5: Consideraciones sobre el momento del inicio del tratamiento: pre o post- TR.



En las Guías KDIGO de 2018 se recomienda:

- El momento del tratamiento de la infección por VHC debería decidirse basándose en el tipo de donante (vivo vs cadáver), el tiempo en lista de espera, política intra-centro sobre la utilización de donantes VHC positivos, el genotipo del VHC y la severidad de la fibrosis hepática. (123).

Los pacientes en hemodiálisis deben ser considerados candidatos a tratamiento antiviral tanto si son o no candidatos a TR, como si tienen o no fibrosis. En aquellos con fibrosis hepática no significativa el tratamiento antiviral puede ser pospuesto al periodo post-TR, lo que les permitiría trasplantarse antes con un injerto VHC positivo. (124).

1.5. Donación de órganos

A pesar de las precauciones, para la transmisión de infecciones en el trasplante de órganos, todavía existe el riesgo de transmisión de la infección por el VHC. En pacientes anti VHC negativo, VHC-ARN es positivo en menos del 1 % (0,2-0,9%). (125). Las determinaciones de VHC- ARN y el antígeno del core no se realizan de forma sistemática en los trasplantes de órganos debido a su alto coste y la complejidad de los procedimientos.

La transmisión de VHC positivo de donante a receptor es casi del 100%. (126).

1.5.1. Donación VHC +, a receptor VHC+

No hay duda de que incluso en la era pre-AAD los pacientes con ERC y VHC positivos se beneficiaban de TR. Sin embargo, si este beneficio persistía cuando riñones de donantes VHC positivos eran trasplantados en pacientes VHC positivos ha sido siempre objeto de controversia, ya que aunque presentan peor evolución que aquellos que reciben uno VHC negativo, permanecen menos tiempo en lista de espera. (127). Las decisiones sobre la utilización de riñones de donantes VHC eran dependientes del centro.

1.5.2. Donación VHC+, a receptor VHC

Debido a la gran disparidad entre las listas de espera y el número de pacientes trasplantados al año, nuevas formas de aumentar el pool de donantes son bienvenidas. Según el registro de donantes de 2012 Organ Procurement Transplant Network, únicamente son utilizados el 2,4% de los donantes HCV +. Aproximadamente el 50%, son descartados. (127-128).

Algunas de las cuestiones pendientes, más importantes son: ¿Los riesgos conocidos asociados con la infección por VHC en el receptor de TR se mitigan mediante la erradicación temprana del VHC con AAD? ¿La supervivencia del injerto y del paciente coincide con la de los receptores de TR no infectados?

En este sentido, recientemente han sido publicados los resultados preliminares del seguimiento a 12 meses de un estudio unicéntrico, que incluyó 20 receptores de TR VHC-, cuyo donante era VHC+, y fueron tratados el tercer día post-TR con elbasvir-grazoprevir. El 100% de los receptores, respondieron eficazmente al tratamiento antiviral, con buena calidad de vida y función renal. (128)

También en pacientes sin infección por el VHC que recibieron un trasplante cardíaco o pulmonar el tratamiento con antivirales durante 4 semanas, iniciado a las pocas horas post-trasplante, previno el establecimiento de la infección por el VHC. (130).

Si los resultados del trasplante de órganos infectados con el VHC (ya sea que el receptor esté o no infectado por el VHC) seguido de la terapia AAD conducen a resultados aceptables a largo plazo, deben desarrollarse estrategias para garantizar que ninguno de estos riñones infectados se descarte innecesariamente. Hay muchas razones para ser optimistas. En los próximos años, tendremos las respuestas a estas preguntas. Mientras tanto, la detección de la infección oculta por el VHC podría ayudar a responder algunas de las controversias existentes hoy en día sobre la infección del VHC.

1.6. Infección oculta por el VHC

1.6.1. Diagnóstico

La infección oculta por el VHC se describió por primera vez en pacientes con anticuerpos anti-VHC negativos al ARN del VHC con valores anormales de enzimas hepáticas pero que presentaban ARN-VHC en el hígado y en CMSP. No siempre se dispone de la biopsia hepática para la infección oculta del VHC, pero la detección del VHC –ARN en CMSP. (131). o como se describió posteriormente, en suero tras concentrar las partículas víricas por ultracentrifugación seguido de detección mediante RT-PCR (132) son procedimientos alternativos que permiten identificar a este grupo de pacientes. Por tanto, para el diagnóstico de la infección oculta por VHC la técnica más sensible es la detección de ARN en el hígado (100%), seguido de la detección en CMSP (>70%), en suero tras ultracentrifugación (>58%) y la detección de anti VHC core (40%). (133-134). La combinación de estos métodos puede detectar mas del 91% de los pacientes en los que se ha comprobado la presencia de VHC oculto positivo mediante biopsia hepática. (135).

Se debe poner atención en los métodos utilizados para el diagnóstico. La estandarización de protocolos que incluyan temperaturas, tiempos y métodos de almacenamiento específicos pueden ayudar a validar los resultados entre las diferentes poblaciones, debido a que estas variaciones pueden afectar al rendimiento de los ensayos. (136).

1.6.2. Tipos

Hasta ahora, se reconocen dos tipos de VHC oculto: VHC oculto seronegativo (anti-VHC y negativo de VHC sérico en suero) y VHC oculto seropositivo (anti-HCV positivo y sérico-HCV-RNA negativo). Los pacientes VHC oculto seropositivos incluyen pacientes que presumiblemente han resuelto la infección por el VHC (espontáneamente o tras tratamiento antiviral y portadores asintomáticos del VHC), pero otras publicaciones (la mayoría de ellas en respondedores a terapia antiviral con RVS), no han encontrado pacientes VHC oculto seropositivos cuestionando su existencia. (137-139). Respecto al VHC oculto seronegativo hay muchas publicaciones que confirman su existencia (140-146), y solo unas pocas en las que no se detecta. (147-148).

Por tanto, el concepto de VHC oculto sigue siendo un tema controvertido, probablemente porque ambos tipos de OCI no se consideran como entidades diferentes. (149).

En la primera publicación de VHC oculto en población española solo se identificó el genotipo 1b del VHC. (150). Posteriormente, se han identificado la implicación de otros genotipos (1a, 2a, 2c, 3a, 3b, 4a) de VHC oculto en distintos trabajos. (151). El VHC oculto puede persistir y replicarse por largos periodos de tiempo. (150). Existe la preocupación sobre si el VHC oculto puede transmitir la infección sobre todo dadas las fluctuaciones en la viremia detectadas mediante ultracentrifugación en suero, y mediante CMSP. Aunque un estudio apoya esta hipótesis se ha sugerido en otra revisión que se debe ser cauto y que se requieren más estudios para corroborar estos datos. (136).

1.6.3. Poblaciones

Se ha descrito su presencia en distintas poblaciones de pacientes: enfermedad hepática criptogénica, hemodiálisis, infectados por el VIH y por el VHB, enfermedades hematológicas, donantes de sangre y en la población general. (13). Las diferencias en prevalencia de VHC oculto pueden ser explicadas según la distribución geográfica del VHC.

A continuación veremos algunos estudios, en algunas poblaciones específicas:

1.6.3.1. Donantes de sangre

En un estudio reciente realizado en China que incluía muestras sanguíneas de donantes de sangre que eran anti VHC negativos y en los que se determinó en CMSP, se encontró una prevalencia del 2,2%. (153). Otro estudio sugirió la presencia de infección por el VHC oculto en donantes de sangre (152).

1.6.3.2. Hemodiálisis y Trasplante renal

Barril et al. analizaron 109 pacientes en hemodiálisis con anormalidad en enzimas hepáticas. La infección por el VHC oculto fue positiva en el 45 % de los pacientes. El 53 % de estos pacientes tenían replicación por el VHC. En el análisis por regresión logística la mortalidad se asoció a la edad (>60 años) y a la presencia de VHC oculto (Odds Ratio 3,82; 95% IC 1,29-11,43). La duración del tiempo en diálisis también se relacionó con la presencia de VHC oculto, sugiriendo que su presencia podía ser debida a infección nosocomial. (154). En otro estudio, realizado sin determinación por ultracentrifugación y en pacientes, sin pre-selección según el resultado en enzimas hepáticas, no se confirmaron estos hallazgos y la prevalencia fue del 3%. (155).

Baid- Agrawal y col. encontraron una baja prevalencia de infección por VHC oculto 2/398 (0,5%) en pacientes con TR y en programa de hemodiálisis. En un seguimiento longitudinal medio de 30 meses de los 3 pacientes con infección oculta por el VHC, no hubo evidencia clínica o virológica de infección por VHC. (156).

Gelpi y col. describieron a seguridad en el post-TR de 3 receptores VHC negativo que recibieron trasplantes renales de 3 donantes VHC positivos tratados con antivirales (2 con interferón y ribavirina y uno con DAA), en los que se excluyó la presencia de Infección por el VHC oculto. (157).

1.6.3.3. Trastornos hematológicos

Estudios sobre la asociación del VHC oculto seronegativo, y enfermedades hematológicas, han demostrado resultados controvertidos. (158). Youssef et al, demostraron una prevalencia del 20% de VHC oculto en pacientes con trastornos linfoproliferativos, a diferencia de Farahani que demostró una baja prevalencia (1,9%). (159-161).

Las diferencias entre países se pueden explicar por las diferencias en seroprevalencia de VHC. Ahmed Hashem et al. describieron una elevada prevalencia de VHC oculto en pacientes diagnosticados de mieloma múltiple sugiriendo una relación entre ambas entidades. (162).

1.6.4. Tratamiento antiviral en infección oculta por VHC

Otro estudio describió la respuesta del tratamiento antiviral del VHC oculto. 10 pacientes con VHC oculto positivo (todos genotipo 1), que presentaban VHC- ARN en CMSP (detectables persistentemente), niveles del ALT anormales y hepatitis crónica en biopsia hepática fueron tratados durante 6 meses con INF- PEG y RBV y seguidos durante otros 6 meses. Al final del seguimiento el 60%, presentaban niveles normales de ALT y VHC- ARN era indetectable en 7 pacientes. Los resultados de este estudio sugieren que el patrón de respuesta al tratamiento antiviral es similar a los de la hepatitis C crónica, indicando la replicación del virus en infección oculta por VHC y que las partículas intactas virales están presentes en estos pacientes. (163). Se requieren más estudios que demuestren el beneficio potencial del tratamiento del VHC oculto. (136). Este estudio fue realizado en una época en la que el tratamiento con INF-PEG y RBV eran la forma habitual de tratamiento, y los resultados fueron consistentes con los resultados del tratamiento para la hepatitis crónica por VHC. Con la aparición de nuevos AAD, se requieren nuevos estudios en los que se empleen estos fármacos para el tratamiento por VHC oculto. (136).

1.6.5. Reactivación del VHC post tratamiento antiviral

La presencia de ARN del VHC después de la ultracentrifugación de muestras de suero durante el seguimiento de pacientes con hepatopatía crónica por VHC con RVS se ha descrito previamente que predice la reactivación de la infección por el VHC en pacientes tratados con antivirales convencionales. (164).

1.7 Bibliografía

- 1 Hajarizadeh B, et al. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:553-562;
- 2 Negro F, et al. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Journal of Hepatol* 2014; 61: S69-S78.
- 3 Kliem V, et al. Relationship of hepatitis B or C virus prevalences, risk factors, and outcomens in renal transplant recipients: analysis of German data. *Transplant Proc* 2008; 40: 909-914.
- 4 Gower E, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 61, S45-S67.
- 5 Zhang QL, et al. Prevalence of chronic kidney disease in population -based studies: systematic review. *BMC public health* 2008; (8): 117.
- 6 Otero A, et al. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of EPIRCE study. *Nefrología* 2010; 30 (1):78-86.
- 7 Molnar M, et al. Association of hepatitis C virus infection with incidence and progression of chronic kidney disease in a large cohort of US veterans. *Hepatology* 2015; 61 (5): 1495-1502.
- 8 Fissell RB, et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversión in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney Int* 2004; 65 (6): 2335-42.
- 9 García Agudo R et al. SCHETS multi-centre Spanish Study: liver situation of patients with chronic hepatitis from HCV on renal replacement therapy with haemodialysis. *Nefrología* 2013; 33: 188-195).
- 10.- KDIGO Clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008; 73 (109): S1-S9.
- 11.- Informe mundial sobre la diabetes. www.who.int.
- 12.- Choo QL, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359.
- 13.- Jonhson RJ. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993, 328:465-470.

- 14.- Castillo I, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver function test is unknown. *J Infect Dis.* 2004; 189: 7-14
- 15.- Hajarizadeh et al. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:553-562;
- 16.- Progress report on access to hepatitis C treatment. Focus on overcoming barriers in low- and middle-income countries. WHO reference number: WHO/CDS/HIV/18.4
- 17.- WHO. Combating hepatitis B and C to reach elimination by 2030. Geneva. World Health Organization, 2016.
- 18.- Lin HJ, et al. The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidate epitopes. *Virus Res* 1993; 30: 27-41.
- 19.- Antaki N, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* 2010; 30: 342-355.
- 20.- Albillos A, y col. AEEH, SEMERGEN, semFYC, SEMG. Consenso de recomendaciones para el diagnóstico precoz, la prevención y la atención clínica de la hepatitis C en Atención Primaria. Madrid: Luzan 5; 2017.
- 21.- Kirat Gill, et al. Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. *Hepatol Int* (2016) 10:415–423
- 22.- Sandri AM, et al. Treatment of hepatitis C-mediated glomerular disease. *Nephron Clin Pract* 2011; 119 (2) c 121-30.
- 23.- Diego JM. Treatment of hepatitis C infection in patients with renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7:557-62;
- 24.- Gopalani A, et al. Prevalence of glomerulonephropathies in autopsies of patients infected with hepatitis C virus. *Am J Med Sci* 2001; 322:57-60;
- 25.- Meyers CM, et al. Hepatitis C and renal disease: an update. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:631-57.
- 26.- Wornle M. Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2006; 168, 370-385.
- 27.- White DL, et al. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008; 49:831-44.
- 28.- Naing C, et al. Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes

- mellitus: meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; 18:1642-51.
- 29.- D'Souza et al. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100; 1509-1515).
- 30.- Cusi K. The relationship between hepatitis C virus infection and diabetes: time for a divorce?. *Hepatology* 2014; 60 (4):1139-49.
- 31.- Ruhl CE, et al. Relationship of hepatitis C virus infection with diabetes in the U.S. population. *Hepatology* 2014; 60: 1139-49.
- 32.- Visco C, et al. Hepatitis C virus and diffuse large B-cell lymphoma: pathogenesis, behavior and treatment. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:11054–11061.
- 33.- Li Y, et al. Hepatitis C virus infection and risk of multiple myeloma: Evidence from a meta-analysis based on 17 case-control studies. *J Viral Hepatol* 2017 Dec; 24 (12):1151-1158.
- 34.- Krystyna A, et al. Correlation of hepatitis C and prostate cancer, inverse correlation of basal cell hyperplasia or prostatitis and epidemic syphilis of unknown duration. *Int Braz J Urol*. 2011;37: 223–229.
- 35.- Nagao Y, et al. High prevalence of hepatitis C virus antibody and RNA in patients with oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 1995; 24: 354–360.
- 36.- Fallahi P, et al. Thyroid involvement in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia. *Hormones (Athens)*. 2014; 13:16–23.
- 37.- Su FH, et al. Association between chronic viral hepatitis infection and breast cancer risk: a nationwide population-based case-control study. *BMC Cancer*. 2011; 11: 495.
- 38.- Levey AS; et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives- a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72 (3); 247-259.
- 39.- DuBose TD, Jr. American Society of Nephrology Presidential Address 2006: chronic kidney disease as a public health threat-new strategy for a growing problem. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (4): 1038-45.
- 40.- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Hepatitis C Work Group. KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2018; 8:91-165.

- 41.- Levey AS, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130 (6): 461-70.
- 42.- Brenner BM. Retarding the progression of renal disease. *Kidney Int* 2003, 64(1): 370-78.
- 43.- Ricardo Gómez Huelgas y col. Documento de Consenso sobre el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2014; 34 (1): 34-45.
- 44.- Tuttle KR, et al. Diabetic kidney disease: A report from ADA Consensus Am J Kidney Disease 2014; 64 (4): 510-533.
- 45.- Soma J, et al. High prevalence of adverse effect of hepatitis C virus in type II diabetic related nephropathy. *Am Soc Nephrol* 2000, 11:690-699),
- 46.- Crook et al. Hepatitis C is a poor predictor survival in diabetic patients. *Diabetes Care* 2005; 28:2187-2191.
- 47.- Ocak S, et al. Seroprevalence of hepatitis C in patients with type 2 diabetes mellitus and non diabetic on haemodialysis. *Int J Clin Prac* 2006; 60:670-674
- 48.- Kamar N, et al. Hepatitis C virus and kidney disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37 (4) 328-33.
- 49.- Johnson et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328:465-470.
- 50.- Alric L et al. Influence of antiviral therapy in hepatitis C virus -associated cryoglobulinemic MPGN. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 617-23;
- 51.- Rossi P, et al. Hepatitis C virus related cryoglobulinemic glomerulonephritis: long-term remission after antiviral therapy. *Kidney Int* 2003; 63:2236-41.
- 52.- Molnar MZ, et al. Association of hepatitis C viral infection with incidence and progression of chronic kidney disease in a large cohort of US veterans. *Hepatology* 2015; 61 (5): 1495-502.
- 53.- Pereira et al. The New England Organ Bank Hepatitis C Study Group: Effects of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 53: 1374-1381, 1998

- 54.- Butt AA, et al. Impact of hepatitis C virus infection and other comorbidities on survival in patients on dialysis. *J Viral Hepatol* 2007; 14: 688-96.
- 55.- Fabrizi F, et al. The impact of hepatitis C virus infection on survival in dialysis patients. *J Viral Hepatol* 2007:697-703.
- 56.- Kalandar-ZadehK, et al. Hepatitis C infection on dialysis patients: A link to poor outcome? *Int Urol Nephrol* 2007; 39: 247-59.
- 57.- Ingsathit A, et al: Survival advantage of kidney transplantation over dialysis in patients with hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *Transplantation* 95: 943-948, 2013
- 58.- Cruzado JM, et al. Hepatitis C virus infection and the novel glomerular lesions in renal allografts. *Am J Transplant* 2001; 1:171-8
- 59.- Gane E, et al. Management of chronic viral hepatitis before and after renal transplantation. *Transplantation* 2002; 74:427-37;
- 60.- Hanafusa T, et al. Retrospective study on the impact of hepatitis C virus infection on kidney transplant patients over 20 years. *Transplantation* 1998; 66:471-6,
- 61.- Fabrizi et al. Hepatitis C virus antibody status and survival after renal transplantation: a meta-analysis of observational studies. *Am J Transplant* 2005;5 1452-1461. 8
- 62.- Improving Global Outcomes (KDIGO) Hepatitis C Work Group. KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2018; 8:91-165.
- 63.- Rosen HR et al. Use of OKT3 is associated with early and severe recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1453-1457
- 64.- Roth et al. Effect on kidney transplantation on outcomes among patients with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1152-1160.
- 65.- Manuel O, et al. Immunosuppression in hepatitis C virus infected patients after kidney transplantation. *Contrib Nephrol* 2012; 176:97-107
- 66.- Luan et al. Impact of immunosuppressive regimen on survival of kidney transplant recipients with hepatitis C. *Transplantation* 2008; 85: 1601-1606).
- 67.- Akalin et al. Rapid steroid withdrawal in hepatitis C virus –positive kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 2004; 18: 384-389

- 68.- Kahraman et al. Impact of immunosuppressive therapy on hepatitis C infection after renal transplantation. *Clin Nephrol* 2011; 75: 16-25.
- 69.- Hsu et al. New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013;
- 70.- Nakagawa et al. Suppression of hepatitis C virus replication by ciclosporin is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 2005; 129: 1031-1041.
- 71.- Hsu et al. New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013;
- 72.- Pan Q et al. Mycophenolate acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* 2012; 55: 16773-1683.
- 73.- Luan et al. Impact of immunosuppressive regimen on survival of kidney transplant recipients with hepatitis C. *Transplantation* 2008; 85; 1601-1606.
- 74.- Manuel O et al. Immunosuppression in hepatitis C virus infected patients after kidney transplantation. *Contrib Nephrol* 2012; 176:97-107.
- 75.- Kucirka LM. Impact of donor hepatitis C virus infection status on death and need for liver transplant in hepatitis C virus positive kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2012; 60, 112-120.
- 76.- Forman JP, et al. Hepatitis C, acute humoral rejection and renal allografts survival. *Am Soc Nephrol* 2004; 15, 249-255.
- 77.- Pereira BJ, et al. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int* 1997; 51, 981-999;
- 78.- Dominguez-Gil B, et al. Transplantation in the patient with hepatitis C. *Transplant Int* 2009; 22, 1117-1131.
- 79.- Lopez Medrano F et al. Impact of hepatitis C virus infection on the risk of infections complications after kidney transplantation : data from the RESITRA/REIPI cohort. *Transplantation* 2011; 92, 543-549.
- 80.- Torres J et al. Hepatitis C virus, and important risk factor for tuberculosis in immunocompromised: experience with kidney transplantation. *Transplant Int* 2008; 21, 873-878.
- 81.- Burra P et al. Occurrence of post-transplant lymphoproliferative disorders among over

- a thousand adults recipients: any role for hepatitis C virus infection? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18, 1065-1070.
- 82.- Caillard S, et al Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after kidney transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant* 6; 2735-2742 (2006);
- 83.- Caillard S, et al. Myeloma, Hodgkin disease and lymphoid leukemia after kidney transplantation: characteristics, risk factors and prognosis. *Transplantation* 2006; 27, 888-895.
- 84.- Kondo Y, et al. Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J Gastroenterol* 2013; 19, 7889-7895.
- 85.- Sumrani NB, et al. Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine era—an analysis of risk factors. *Transplantation* 1991; 51:343-7.
- 86.- Roth D, et al. Post-transplant hyperglycemia increased incidence in cyclosporine treated renal allograft recipients. *Transplantation* 1989; 47:278-81).
- 87.- Gentil MA et al. High incidence of diabetes mellitus after kidney transplant in patients with hepatitis C. *Nephron* 1999; 82-85).
- 88.- Morales JM, et al. Glomerular diseases in patients with hepatitis C virus infection after kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; (6): 511-515;
- 89.- Fabrizi F, et al. Hepatitis C virus infection and kidney disease: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 549-557.
- 90.- Cruzado JM, et al. Hepatitis C virus associated membranoproliferative glomerulonephritis in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2469-2475,
- 91.- Morales JM, et al. Membranous glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection in renal transplant patients. *Transplantation* 1997; 63: 1634-1639,
- 92.- Baid S, et al. Renal thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibodies in hepatitis C positive renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 146-153.
- 93.- Cosio FG, et al. Prevalence of hepatitis C in patients with idiopathic glomerulopathies in native and transplant kidneys. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 752-758.
- 94.- Forman JP, et al. Hepatitis C, acute humoral rejection, and renal allograft survival.

- J Am Soc Nephrol 2004; 15: 249-255,
- 95.- Hestin D, et al. Pretransplant hepatitis C virus infection: a predictor of proteinuria after renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 741-744.
 - 96.- Morales JM et al. Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11: 172-182.
 - 97.- Bruchfeld A, et al. Hepatitis C infection, time in renal replacement therapy, and outcome after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 745-750;
 - 98.- Gentil MA, et al. Impaired kidney transplant survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. *Nephrol Dial transplant* 1999; 94: 2455-2460.
 - 99.- Scott DR, et al. Adverse impact of hepatitis C virus infection on renal replacement therapy and renal transplant patients in Australia and New Zealand. *Transplantation* 2010; 90 :1165-1171.
 - 100.- Fabrizi F, et al. Post-transplant diabetes mellitus and HCV seropositive status after renal transplantation: meta-analysis of clinical studies. *Am J Transplant* 2005; 5: 1452-1461.
 - 101.- Rostami Z, et al. The impact of hepatitis C virus infection on kidney transplantation outcomes: A systematic review of 18 observational studies. *Hepat Mon* 2011;11: 247-254.
 - 102.- Rostami Z, et al. The impact of hepatitis C virus infection on kidney transplantation outcomes: A systematic review of 18 observational studies. *Hepat Mon* 11, 247-254 (2011).
 - 103.- Fabrizi F, et al. Meta-analysis of observational studies: Hepatitis C and survival after renal transplant. *J Viral Hepat* 2014; 21:314-324.
 - 104.- Baid- Agrawal, et al. Hepatitis C virus infection and Kidney Transplantation in 2014: What's new?. *American Journal of Transplantation* 2014; 14:2206-2220.
 - 105.- Adinolfi L, et al. Chronic hepatitis C virus infection and atherosclerosis: clinical impact and mechanism *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3410-17.
 - 106.- Jacobson IM, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 23; 364 (25): 2405-16.
 - 107.- Poordad F, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364 (13):1195-206.

- 108.-Gordon SC, et al. Safety profile of boceprevir and telaprevir in chronic hepatitis C: real world experience from HCV-TARGET. *J Hepatol* 2015; 62 (2):286-93.
- 109.- Fornis X, et al. Glecaprevir plus pibrentasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1,2,4,5 or 6 infection in adults with compensated cirrhosis (EXPEDITION -1) a single arm, open label, multicenter, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2017; 17 (7): 1062-8.
- 110.- Roth D et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment naive and treatment experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4-5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. *Lancet* 2015; 386; 1537-45.
- 111.- Younossi ZM et al. Disparate access to treatment regimens in chronic hepatitis C patients: data from the TRIO network. *J Viral Hepatol* 2016; 23 (6),447-54.
- 112.- Pockros PJ, et al. Efficacy of Direct-Acting antiviral combination for the patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and severe renal impairment or end stage renal disease. *Gastroenterology* 2016; 150(7):1590-8.
- 113.- Li T, et al. Efficacy and safety of direct-acting antivirals-based antiviral therapies for hepatitis C virus patients with stage 4-5 chronic kidney disease: a meta-analysis. *Liver Int* 2017; 37 (7): 974-81.
- 114.- Andrew J Malone, et al. Modern Hepatitis C virus therapy and its effect on transplantation. *Nephrology Self Assessment Program* 2017; 16: 273- 79.
- 115.- Beinhardt S, et al. DAA- based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C in the pre- and post-kidney transplantation setting. *Transpl Int* 2016; 29:299-1007.
- 116.- Lin MV, et al. Efficacy and safety of direct acting antivirals in kidney transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2016; 11: e0158431.
- 117.- Kamar N, et al. Efficacy and safety of sofosbuvir -based antiviral therapy to treat hepatitis C virus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2016; 16:1474-9.
- 118.- Lubetzky M, et al. Safety and efficacy of treatment Hepatitis C in kidney transplant recipients with direct acting antiviral agents. *Transplantation* 2017; 101:1704-10.
- 119.- Sawanski D, et al. Successful treatment of hepatitis C in renal transplant recipients with direct-acting antiviral agents. *Am J Transplant* 2016; 16:1588-95.

- 120.- Keliang Chen, et al. Direct-acting antiviral agent efficacy and safety in renal transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. A PRISMA-compliant study. *Medicine* 2017; 96:30.
- 121.- Chute DF, et al. Direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection in the kidney transplant recipient. *Kidney Int* 2018; 93 (3): 560-7.
- 122.- Chute DF, et al. Direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection in the kidney transplant recipient. *Kidney Int* 2018; 93 (3): 560-7.
- 123.- Improving Global Outcomes (KDIGO) Hepatitis C Work Group. KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2018; 8:91-165.
- 124.- Stanislas Pol, et al. An update on the management of hepatitis C virus-infected patients with stage 4-5 chronic kidney disease while awaiting the revised KDIGO guidelines. *Nephrol Dial Transplant* 2017: 32:32-5.
- 125.- Aswad S, et al. Role of nucleic acid testing in cadaver organ donor screening: detection of hepatitis C virus RNA in seropositive and seronegative donors. *J Viral Hepat* 2005; 12: 627-34.
- 126.- Pereira et al. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 325:454-460, 1991.
- 127.- Reese PP, et al. Transplanting hepatitis C positive kidneys. *N Engl J Med* 2015; 373: 303-305.
- 128.- Reese PP, et al. Twelve-month outcomes after transplant of hepatitis C-infected kidneys into uninfected recipients: A single group trial. *Ann Intern Med* 2018; august 7.
- 129.- Goldberg DS, et al. Transplanting HCV -infected kidneys into uninfected recipients. *N Engl J Med* 376:2394-2397, 2017.
- 130.- Woolley AE, et al. Heart and Lung Transplants from HCV-Infected Donors to Uninfected Recipients. *N Engl J Med.* 2019 Apr 25;380(17):1606-1617.
- 131.- Castillo I, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver function test is unknown. *J Infect Dis* 2004; 189:7-14
- 132.- Bartolome J, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol* 2007; 81:7710-7715.

- 133.- Castillo I, et al. Diagnosis of occult hepatitis C without the need for a liver biopsy. *J Med Virol* 2010; 82: 1554-9;
- 134.- Carreño V, et al. Seronegative occult hepatitis C virus infection: Clinical Implications. *J Virol* 2014; 61(3):315-20.
- 135.- Castillo I, et al. Diagnosis of occult hepatitis C virus without the need of o liver biopsy. *J Med Virol* 2010; 82-1554-9.
- 136.- Alyssa Austria et al. Occult hepatitis C virus infection: A Review. *Journal of Clinical and Translacional Hepatology* 2018; 6: 155-160.
- 137.-Fujiwara K, et al. Investigation of residual hepatitis C virus in presumed recovered subjects. *Hepatology* 2013; 57: 483–91.
- 138.- Nicot F, et al. No evidence of occult hepatitis C virus infection in serum of HCV antibody-positive HCV-RNA negative kidney transplant patients. *Transplant Int* 2010; 23: 594-601.
- 139.- Esaki T, et al. Hepatocellular carcinoma in a patient with liver cirrhosis associated with negative serum HCV test but positive liver tissue HCV-RNA. *Intern Med* 2004; 43: 279–82.
- 140.- El-Sayed GM, et al. Viral genomes and antigen detection of hepatitis B and C viruses in involved lymph nodes of Egyptian non-Hodgkin's lymphoma patients. *Egypt J Immunol* 2006; 13: 105–14.
- 141.- De Marco L, et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS ONE* 2009;4: e8128, 10.1371/journal.pone.0008128.
- 142.- Cortés-Mancera FM, et al. Occult hepatitis C virus infection in a re-transplanted patients with liver failure of unknown etiology. *Rev Col Gastroenterol* 2010; 25: 72–80.
- 143.- Saad Y, et al. Prevalence of occult hepatitis C in Egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease. *Open J Intern Med* 2011; 1: 33–7.
- 144.- Roque-Cuéllar MC, et al. Cellular immune responses and occult infection in seronegative heterosexual partners of chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2011; 18: e541–9.
- 145.- De Marco L, et al. Prevalence and follow-up of occult HCV infection in an Italian population free of clinically detectable infectious liver disease. *PLoS ONE* 2012;7:

e43541,

- 146.- Halfon P, et al. Occult hepatitis C virus infection revisited with ultrasensitive real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2106–8.
- 147.- Pisaturo M, et al. Absence of occult HCV infection in patients experiencing an immunodepression condition. *Infez Med* 2013; 21: 296–301.
- 148.- Coppola N, et al. Absence of occult hepatitis C virus infection in patients under immunosuppressive therapy for oncohematological diseases. *Hepatology* 2011; 54: 1487–9.
- 149.- Castillo I, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver function test is unknown. *J Infect Dis.* 2004; 189: 7-14.
- 150.- Castillo I, et al. Long-term virological follow up of patients with occult hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2011; 31:1519-24.
- 151.- Castillo I, et al. Hepatitis C virus in the family setting of patients with occult hepatitis C. *J Med Virol* 2009; 81, 1198-1203.
- 152.- Lin H Chen X, et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection among blood donors in Jiangsu, China. *Intervirology* 2016; 59:204-210.
- 153.- Quiroga JA, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion* 2016; 56: 1883-1890.
- 154.- Barril G, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19 (12): 2288-92.
- 155.- Naghdi R, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2288-92.
- 156.- Baid- Agraiwal S, et al. Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and Kidney transplant patients. *J Hepatol* 2014; 60: 928-933.
- 157.- Gelpi R, et al. Safety of hepatitis C virus (HCV)-treated donors for kidney transplantation excluding occult HCV infection through kidney biopsies. *Transpl Int.* 2018 Aug;31(8):938-939.

- 158.- Helaly GF, et al. Seronegative and occult hepatitis C virus infection in patients with hematological disorders. *Arch Virol* 2017; 1; 63-9.
- 159.- Youssef SS, et al. Prevalence of occult hepatitis C virus in Egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat Res Treat* 2012; 2012; 429784.doi: 10.1155/2012/429784.
- 160.- Maryam Farahani, et al. Prevalence of Occult Hepatitis C Virus Infection in Iranian Patients with Lymphoproliferative Disorders. *J Med Virol* 2013; 85 (2):235-40.
- 161.- Ghada Mohamed El-sayed, et al. Viral Genomes and Antigen Detection of Hepatitis B and C Viruses in involved Lymph Nodes of Egyptian Non-Hodgkin's Lymphoma Patients. *Egypt J Immunol* 2006;13 (1):105-14.
- 162.- Ahmed Hashem, et al. Prevalence of Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Multiple Myeloma *Med. J. Cairo Univ.*, Vol. 83, No. 1, June: 507-513, 2015.
- 163.- Pardo M, et al. Effect of anti-viral therapy for occult hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1153-9.
- 164.- Castillo I, et al. Presence of HCV- RNA after ultracentrifugation of serum samples during the follow-up of chronic hepatitis C patients with a sustained virological response may predict reactivation of hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 30; 477-486.

CAPITULO 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PRESENTACIÓN DE ESTUDIOS

2.1. Justificación e hipótesis

La comprobación de la existencia de la infección oculta por VHC y la repercusión del VHC diagnosticado de forma convencional en la ERC en estadios anteriores a la diálisis y en el TR sugiere que esta infección oculta puede afectar al pronóstico, ya que en pacientes en hemodiálisis el VHC oculto confiere una peor evolución. Su detección podría resolver controversias vigentes sobre la infección del VHC en glomerulopatías, ND o TR.

Contrastar en receptores de TR, la eficacia (determinando la presencia de VHC oculto), seguridad y repercusión clínica (hepática y renal) del tratamiento con los nuevos AAD en comparación con los antivirales convencionales y su utilidad o no en la presencia del VHC oculto, se podría sugerir según los resultados de este trabajo. Esto podría ser una línea de investigación futura.

2.2. Objetivos

- Objetivos generales:

- Determinar la prevalencia de la infección oculta por el VHC seronegativa, en distintas poblaciones de pacientes con ERC (nefropatías glomerulares, nefropatía diabética y trasplantados renales).
- Estudiar aspectos clínicos y pronósticos de la infección oculta por el VHC en las distintas subpoblaciones definidas.
- Determinar la eficacia, seguridad y repercusión clínica renal y hepática del tratamiento antiviral en trasplantados renales, con RVS.

- Objetivos específicos:

1.- Original 1:

- Determinar la prevalencia de infección por el VHC oculto en enfermedades glomerulares primarias y secundarias.
- Determinar la presencia de factores de riesgo para la adquisición de infección por el VHC oculto.
- Determinar si la presencia de infección por el VHC oculto produce una evolución más rápida hacia la ERC terminal en enfermedades glomerulares primarias y secundarias.
- Determinar si existe relación entre elevación de parámetros hepáticos en pacientes con y sin infección por el VHC oculto en pacientes con GNIM y GNH.

2.-Original 2:

- Determinar la prevalencia de infección por el VHC oculto en la ND.
- Determinar la presencia de factores de riesgo para la adquisición de infección por el VHC oculto.
- Determinar si la presencia de infección por el VHC oculto en ND favorece la aparición de complicaciones propias de la diabetes.
- Determinar si la presencia de infección por el VHC oculto de ND confiere una evolución más tórpida hacia la ERC terminal.
- Determinar si existe relación entre elevación de parámetros hepáticos en pacientes con y sin infección por el VHC oculto en pacientes con ND.

3.- Original 3:

- Determinar la prevalencia de infección por el VHC oculto en receptores de TR.
- Determinar la presencia de factores de riesgo para la adquisición de la infección por el VHC oculto en receptores de TR. .
- Determinar si la presencia de infección por el VHC oculto en receptores de TR, confiere una supervivencia peor del injerto o del paciente o mayor número de complicaciones (desarrollo de infecciones, tumores, glomerulonefritis de novo o recurrencia, retraso en la función del injerto, aparición de rechazo agudo o rechazo crónico del injerto).
- Determinar si la presencia de infección por el VHC oculto en receptores de TR está favorecida por algún régimen terapéutico inmunosupresor específico o si algún régimen confiere una peor evolución o mayor morbilidad.

4.- Original 4:

- Determinar la prevalencia del VHC oculto en receptores de TR VHC positivos tratados con antivirales.
- Determinar la eficacia del tratamiento antiviral mediante la determinación del ARN del VHC por ultracentrifugación o en CMSP.
- Determinar la seguridad del tratamiento antiviral (efectos adversos, interacciones farmacológicas).
- Determinar la repercusión clínica (hepática y renal), del tratamiento antiviral.

Desarrollo del proyecto:

El equipo investigador implicado en el proyecto lleva colaborando desde el año 2010, en el estudio de la infección por VHC oculto y su asociación con ERC.

2.3. Pacientes y métodos

Original 1: Glomerulonefritis e infección por el VHC oculto.

Se incluyeron 113 pacientes (87 pacientes con glomerulopatías primarias o secundarias y 26 pacientes con nefropatías glomerulares secundarias). El diagnóstico renal se realizó mediante biopsia renal. El periodo de reclutamiento fue junio de 2009 a enero de 2012.

Original 2: ND e infección por el VHC oculto.

Se incluyeron 125 pacientes, diagnosticados de ND. La DM fue definida utilizando los criterios de la *American Diabetes Association*, confirmando dichos criterios mediante técnicas de laboratorio. La ND fue definida como diabetes de larga evolución con albuminuria (ratio albumina/creatinina >30mg/g) y alteración en la función renal (FG<60 ml/min per 1,73m²). Se reclutaron pacientes con distintos estadios de insuficiencia renal, desde 2012 hasta febrero de 2015.

Original 3: Trasplantados renales e infección por el VHC oculto.

Se incluyeron 149 adultos con TR funcionando en todas sus fases evolutivas, con marcadores serológicos negativos de infección por el VHC. Se incluyeron pacientes trasplantados renales desde enero de 2006 al 31 de diciembre de 2013, para facilitar un seguimiento mínimo de 1 año. El periodo de reclutamiento se realizó desde octubre-diciembre de 2014 hasta octubre- diciembre de 2015.

Original 4: Receptores de TR anti-VHC positivo, tratados con antivirales, con RVS.

Se incluyeron 18 pacientes receptores de TR mayores de 18 años, cuyo VHC había sido tratado con antivirales y presentaban RVS. Se excluyeron aquellos pacientes que no hubieran alcanzado la RVS o tuvieran una reactivación de la viremia. El periodo de reclutamiento se realizó desde octubre de 2017 hasta junio de 2018.

NOTA: Los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz y fueron llevados a cabo según la Declaración de Helsinki. Se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente. Todos los pacientes acudían a consultas externas de Nefrología del Hospital Universitario La Paz.

Métodos

Las muestras fueron extraídas en el Hospital Universitario la Paz, y enviadas en un periodo menor a 24 horas a la Fundación para el Estudio de Investigaciones Virales. A todos los pacientes que se incluyeron en los estudios se les tomó una muestra de sangre anticoagulada para aislar plasma y CMSP mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Las CMSP (resuspendidas en RNA later) y las muestras de plasma se

almacenaron a -20^o hasta el momento de detección de VHC- ARN. Para confirmar que todos los pacientes incluidos eran VHC- ARN negativo en suero, se determinó este marcador en 250ml de plasma en todos ellos mediante RT- PCR a tiempo real con sondas FRET dirigidas a la región 5' no codificante del genoma vírico (método convencional). Los pacientes con el resultado positivo fueron excluidos del estudio y reemplazados por los siguientes.

El estudio de la infección oculta por VHC se realizó por:

1) Detección cuantitativa de la cadena genómica y antigenómica del VHC-RNA en CMSP.

Se aisló el ARN total a partir de las CMSP utilizando el kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Una vez precipitado el ARN total, éste se resuspendió en 10 µl de agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Se realizó la detección del VHC-ARN genómico y antigenómico (indicativo de replicación del virus) presente en las CMSP utilizando 0.5 µg del ARN total mediante RT-PCR a tiempo real específica de cadena con sondas FRET dirigidas a la región 5' no codificante del genoma del VHC. La cuantificación del genoma vírico se extrapoló a partir de una curva estándar realizada con VHC - ARN sintético de concentraciones conocidas. Para asegurar la especificidad de los resultados se procesaron simultáneamente con las muestras problemas al menos tres controles negativos (muestras de plasma y CMSP reiteradamente negativas y muestras de agua).

2) Determinación cuantitativa del VHC- ARN en plasma tras ultracentrifugación.

En las muestras de plasma de todos los pacientes incluidos en el estudio se concentraron las partículas víricas circulantes ultracentrifugando 2 ml de plasma 100.000xg durante 18 horas a 4^oC, sobre un colchón de sacarosa al 10%. Del precipitado se aisló el ARN total para determinar y cuantificar la presencia de VHC-ARN mediante RT-PCR a tiempo real con sondas FRET. En este caso también se procesaron simultáneamente con las muestras problemas los controles negativos (muestras de plasma reiteradamente negativos por esta técnica y suero fetal bovino). Todas estas determinaciones se realizaron por duplicado en diferentes tiradas. La detección de VHC-ARN en CMSP y/o en suero tras ultracentrifugación indicaron la existencia de infección oculta por VHC.

Variables:

Original 1: Glomerulonefritis e infección oculta por VHC.

Se recogieron datos demográficos: edad, sexo, tipo de enfermedad renal, factores de riesgo para la infección oculta por el VHC (conviviente, tatuaje, piercing, transfusiones, intervenciones quirúrgicas). Función renal (Creatinina, aclaramiento de creatinina), proteinuria, y parámetros hepáticos (GOT, GPT, LDH, FA, bilirrubina) al inicio y al final del seguimiento. Causa de pérdida, y en caso de exitus, el motivo.

Original 2: Diabetes mellitus e infección oculta por VHC.

Se recogieron datos demográficos, edad, sexo, tipo de diabetes, evidencia de complicaciones de diabetes (retinopatía, neuropatía, cardiopatía isquémica, accidente cerebro-vascular), tipo de tratamiento para la diabetes (antidiabéticos orales, insulina), factores de riesgo para la infección oculta por el VHC (conviviente, tatuaje, piercing, transfusiones, intervenciones quirúrgicas). Función renal (Creatinina, aclaramiento de creatinina), proteinuria, y parámetros hepáticos (GOT, GPT, LDH, FA, bilirrubina) al inicio y al final del seguimiento. Causa de pérdida, y en caso de exitus, el motivo.

Original 3: TR e infección oculta por VHC.

Se recogieron datos demográficos: edad, sexo, tiempo en diálisis, tipo de diálisis, etiología de la enfermedad renal, tiempos de isquemia presencia de retraso de la función inicial del injerto, rechazo agudo, edad del donante, complicación por CMV, Creatinina y proteinuria a los 6-12 meses del trasplante renal y actual. Desarrollo de diabetes postrasplante renal. Se valoraron también los parámetros hepáticos (AST, AST, GGT, FA, Bilirrubina, LDH), la inmunosupresión acumulada (anticuerpos monoclonales de inducción) y fármacos inmunosupresores actuales (anticalcineurínicos vs inhibidores de mTOR, tratamiento con/sin esteroides). Desarrollo de infecciones postrasplantes y neoplasias. También se recogieron potenciales factores de riesgo para el desarrollo de infección por el VHC (convivientes con infección por VHC, tatuajes, piercing, transfusiones sanguíneas).

Original 4: Receptores de TR anti-VHC positivo, tratados con antivirales, con RVS.

Se recogieron variables demográficas, en relación a la causa de la ERC, el tipo de diálisis recibida, el número de trasplantes previos, el genotipo del VHC y los tratamientos antivirales recibidos, así como el momento de tratamiento antiviral (diálisis o con TR funcionante). En aquellos receptores de TR tratados post-TR se analizó la función hepática y renal pre y post-tratamiento con AAD, así como la presencia de RA del injerto renal, interacciones y complicaciones del tratamiento antiviral.

Estadística:

Bases de datos: Con el fin de mantener la confidencialidad de los datos estos se recogieron en una base de datos de SPSS. Una vez completada dicha base de datos, los pacientes fueron identificados mediante códigos numéricos. Los pacientes se encontraron identificados en otra base de datos Excel donde constaba exclusivamente el código numérico del paciente, su nombre y su número de historia. Las bases de datos se guardaron en el servidor del hospital.

Análisis estadístico:

Las variables categóricas fueron comparadas usando chi-cuadrado test o el test exacto de Fisher, según correspondiera. Las variables continuas fueron comparadas usando t de Student o test de la U de Mann-Whitney. Se realizó un análisis multivariante de regresión logística para determinar los factores independientemente asociados a la ausencia o presencia de infección oculta por VHC. Todo ello utilizando el programa SPSS versión 20.0

CAPITULO 3: GLOMERULONEFRITIS E INFECCIÓN OCULTA POR EL VHC

Resumen

La asociación de la infección por VHC y la glomerulonefritis es bien conocida. Sin embargo, la relación entre la GNIM y el VHC oculto, caracterizada por la presencia de ARN-VHC en el hígado o en células mononucleares de sangre periférica en ausencia de marcadores serológicos, se desconoce. Determinamos el VHC oculto en 113 pacientes anti-VHC negativos; 87 con GNIM y 26 controles con NGH. Todos los pacientes fueron negativos al ARN-VHC en suero por PCR convencional en tiempo real. Significativamente, ARN-VHC oculto (ARN viral detectable en CMSP o en suero después de la ultracentrifugación) se encontró en 34 de 87 pacientes con GNIM versus 1 de 26 pacientes del grupo control. Los niveles de creatinina en suero fueron significativamente más altos en pacientes con GNIM que en aquellos sin VHC oculto (1,5 versus 1,1 mg / dl, respectivamente). Un análisis multivariado ajustado por sexo mostró un riesgo significativamente mayor de VHC oculto en pacientes con GNIM versus los controles (odds ratio de 13.29). La progresión a la ERC terminal tiende a ser más rápida en pacientes con GNIM y VHC oculto que en los casos negativos. Por lo tanto, el VHC oculto está fuertemente asociado con la GNIM y puede tener un papel en la progresión de la ERC.

Introducción

El VHC es un virus de ARN monocatenario que se replica mediante la síntesis de una molécula de ARN complementaria (cadena de ARN del VHC antisentido). Aunque el hígado es el objetivo principal de la infección por VHC, una proporción significativa de la morbilidad asociada al VHC se debe a patologías extrahepáticas.(1) Estas manifestaciones extrahepáticas pueden ocurrir debido a una autoinmunidad generalizada inducida por el virus o una acción directa del VHC, ya que el ARN del VHC se ha detectado en varios tipos de células extrahepáticas y órganos, incluido el riñón (2,3).

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por VHC está estrechamente relacionada con varias enfermedades renales crónicas, como la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I con y sin crioglobulinemia, la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo III y la nefropatía membranosa (4-6). La característica común de las enfermedades renales asociadas al VHC es la existencia de complejos inmunes del VHC en el tejido renal (7-9).

El diagnóstico de infección por VHC se basa en la detección de anticuerpos contra las proteínas VHC (anti-VHC) y ARN-VHC en suero (10). Sin embargo, el uso de análisis

de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensibles ha demostrado la presencia de ARN-VHC en suero de algunos pacientes anti-VHC negativos. Este estado, denominado infección seronegativa por el VHC, se encontró no solo en ciertas condiciones clínicas, como la infección por VIH y la hemodiálisis, sino también en la hepatitis criptogénica y en donantes de sangre y órganos (11-20). Se identificó otra forma de infección VHC seronegativa denominada VHC oculta en pacientes con enfermedad hepática crónica de origen desconocido (21). Esta infección oculta por el VHC se caracteriza por la detección de ARN del VHC en el hígado en ausencia de anti-VHC y ARN-VHC en el suero, incluso en el uso de técnicas altamente sensibles. Además, una proporción de pacientes con VHC oculta puede tener ARN-VHC en CMSP y se pueden detectar niveles muy bajos de ARN VHC en suero después de la ultracentrifugación de grandes volúmenes de suero para concentrar partículas virales (22). Éstas técnicas pueden ser útiles para el diagnóstico de VHC oculto cuando no se dispone de una biopsia hepática. Utilizando estos métodos, la infección oculta por el VHC también se describió en la cirrosis hepática criptogénica, el carcinoma hepatocelular, los trastornos linfoproliferativos, los pacientes en hemodiálisis con valores anormales de enzimas hepáticas de origen desconocido, e incluso en sujetos sanos sin evidencia de enfermedad hepática (23-29).

Sobre la base de las premisas anteriores, este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia y la posible significación clínica de la infección oculta por el VHC en una población de pacientes con anti-VHC negativos con GNIM.

Resultados

Este estudio prospectivo incluyó un total de 113 pacientes adultos con glomerulonefritis que se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos comprendía 87 casos con GNIM (65 pacientes con glomerulonefritis primaria y 22 con glomerulonefritis secundaria) y el otro grupo (grupo control) tenía 26 pacientes con NGH (Tabla 1).

Tabla 1: Características clínicas y demográficas de los 113 pacientes	
Edad (años; media \pm DS)	49,3 \pm 17,8
Mujer (n; %)	65 ; 57,5
Duración de enfermedad renal (meses; media \pm DS)	133,5 \pm 107,8
Creatinina sérica (mg/dl; media \pm DS)	1,36 \pm 1,27
Aclaramiento de creatinina (ml/min per 1,73 m ² ; (media \pm DS)	88,6 \pm 42,9
Cockcroft-Gault (ml/min;media \pm DS)	83,6 \pm 40,1
<i>Enfermedad glomerular primaria (n; %)</i>	
Síndrome nefrótico idiopático	26; 23
Nefropatía membranosa	20; 17,7
Nefropatía IgA	14; 12,4
Glomerulonefritis membranoproliferativa	3; 2,6
Nefropatía Inmunotactoide	2; 1,8
<i>Nefropatía glomerular secundaria (n; %)</i>	
Nefropatía lúpica	15; 13,3
Vasculitis ANCA positivo	7; 6,2
<i>Nefropatía glomerular hereditaria (n; %)</i>	
Síndrome de Alport	13; 11,5
Enfermedad por membrana basal delgada	8; 7,1
Hematuria familiar benigna	5; 4,4

El síndrome nefrótico idiopático incluye nefropatía por mínimos cambios, la glomeruloesclerosis segmentaria y focal y la nefropatía IgM.

La nefropatía membranoproliferativa tipos I, II y III.

Valores normales para creatinina sérica \leq 1,3 mg/dl; Valores normales para Cockcroft – Gault $>$ 90ml/min

Al comparar las características demográficas y clínicas de los dos grupos de pacientes incluidos en el estudio, se encontró que la proporción de mujeres (20/26: 77%) y la duración de la la enfermedad renal (233 \pm 99,5 meses) fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con NGH que en pacientes con GNIM (45/87: 52%, P=0,025 y 103,8 \pm 91,5 meses, P=0,001, respectivamente). Por el contrario, el número de pacientes que informaron de factores de riesgo para la adquisición de infección por VHC (transfusiones de sangre, tatuajes o piercings, o el contacto doméstico con un portador crónico de VHC) fue significativamente mayor (P=0.007) en el grupo de GNIM (25/87; 29%) que en el grupo control (1/26; 4%). No se encontraron otras diferencias entre ambos grupos de pacientes (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros demográficos y clínicos de los dos grupos de pacientes			
	Glomerulonefritis Inmunomediada (n=87)	Nefropatía Glomerular Hereditaria (n=26)	P
Edad (años; media ± DS)	19,8 ± 18,6	47,5 ± 14,5	0,577
Mujer (n; %)	5;52	20;77	0,025
Duración de enfermedad renal (meses; media ± DS)	103,8 ± 91,5	232,8 ± 99,5	0,001
Creatinina sérica (mg/dl; media ± DS)	1,24 ± 0,7	1,78 ± 2,3	0,055
Aclaramiento de creatinina (ml/min 1,73m ² ; media ± DS)	87,5 ± 38	92,5 ± 47,7	0,611
Cockcroft-Gault (ml/min; media ± DS)	82,7 ± 38	86,4 ± 47,2	0,694
Factores de riesgo de adquisición del virus de la hepatitis C (n; %)	25; 29	1;4	0,007

Valores normales para creatinina sérica $\leq 1,3$ mg/dl; Valores normales para Cockcroft- Gault > 90 ml/min. Factores de riesgo para la adquisición del virus de la hepatitis C transfusiones sanguíneas, tatuajes/piercing, contacto con conviviente con un portador del virus de la hepatitis C.

El ARN del VHC sérico se determinó mediante PCR convencional en tiempo real (con 250 ml de suero) en los 113 pacientes y todos fueron negativos. Al detectar la cadena de ARN del VHC en muestras de CMSP, se encontró que 29/87 (33%) pacientes con GNIM que eran negativas en el ARN-VHC en suero por la técnica de PCR convencional tenían ARN del VHC en CMSP con una carga media \pm s.e.m. de $4.7 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^4$ copias / mg de ARN total. En 17 de estos 29 pacientes (59%), también se detectó la cadena de ARN del VHC antisentido (replicación del VHC) en CMSP (media \pm s.e.m. $2,6 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$ copias / microg de ARN total). Además, se detectó el ARN del VHC en el suero después de la ultracentrifugación en otros cinco pacientes adicionales (media \pm s.e.m. 99 ± 16 copias / ml). Ningún paciente fue simultáneamente positivo para el ARN del VHC en las PBMC y en el suero después de la ultracentrifugación. Por lo tanto, se diagnosticó una infección oculta por el VHC (ARN del VHC en CMSP o en el suero después de la ultracentrifugación) en 34/87 (39%) pacientes negativos al VHC con GNIM. Por el contrario, la infección oculta por VHC se identificó solo en CMSP de 1/26 (3.8%) pacientes con NGH (P =0,001). Todos los controles negativos incluidos en los ensayos de PCR fueron siempre negativos y los resultados de la detección del ARN del VHC realizados de forma ciega por diferentes operadores en días diferentes fueron idénticos en todos los casos.

El análisis de la secuencia de la región del núcleo del VHC aislada de CMSP de siete pacientes seleccionados al azar y del suero (después de la ultracentrifugación) de otros dos pacientes mostró que los aislados del VHC pertenecían al genotipo 1b. El árbol filogenético demostró que, en cada paciente, los clones del VHC se agruparon en la misma rama, pero por separado de los clones de VHC de los otros pacientes, lo que indica que no se produjo contaminación cruzada entre las muestras (Figura 1).

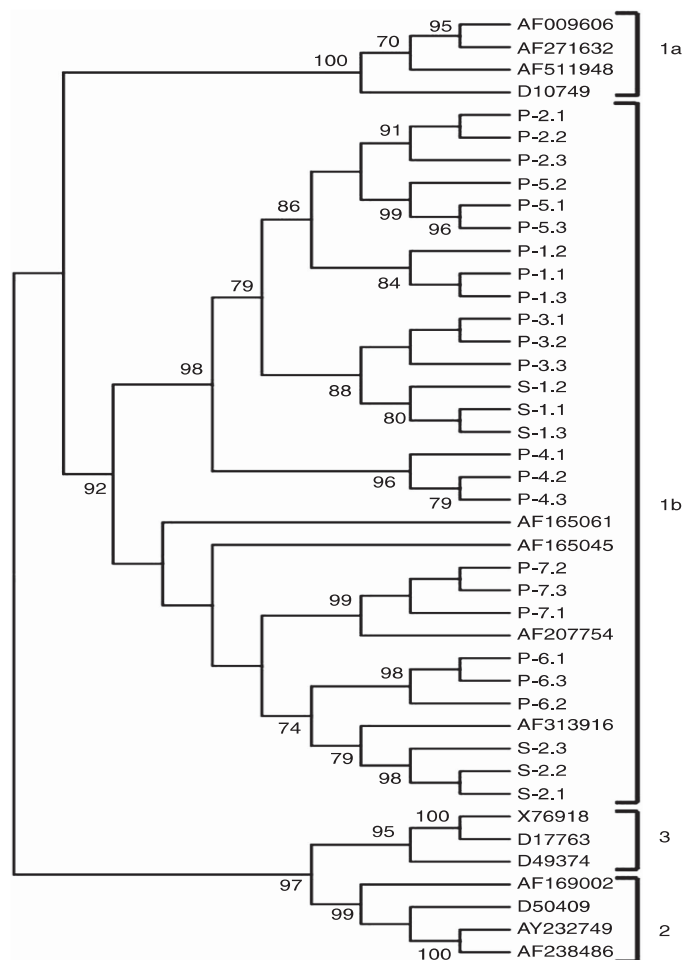


Figura 1: Árbol filogenético construido mediante secuencias de nucleótidos del core del virus de la hepatitis C aislados mediante células mononucleares de sangre periférica de siete pacientes seleccionados al azar, designados mediante "P", y procedentes del suero tras ultracentrifugación de dos pacientes diferentes designados mediante "S" (GenBank accession numbers KF889406-KF889432) en aquellos que corresponde a genotipos 1,2 y 3 del virus de la hepatitis C. Valores de Bootstrap ≥ 70 obtenidos después de 1000 repeticiones de los datos se muestran en los nodos del árbol.

Mediante un análisis univariado, se encontró que la incidencia de infección oculta por el VHC fue significativamente mayor en pacientes con síndrome nefrótico idiopático, nefropatía membranosa, nefropatía por inmunoglobulina A, nefropatía lúpica y vasculitis ANCA positivo en comparación con pacientes con NGH (ver Tabla 3).

Tabla 3: Prevalencia de la infección oculta por el virus de la hepatitis C dependiendo del tipo de glomerulonefritis.						
	Número de pacientes	VHC oculto positivo	Odds Ratio	95% Intervalo de confianza	P	
Síndrome nefrótico idiopático	26	8; 31	11,11	1,28 - 96,86	0,029	
Nefropatía membranosa	20	8; 40	16,67	1,97 - 148,9	0,012	
Nefropatía IgA	14	7; 50	25	2,62 - 238,79	0,005	
Glomerulonefritis membranoproliferativa	3	1; 33	12,5	0,55 - 284,12	0,113	
Nefropatía Inmunotactoide	2	0; 0	0	0	0,999	
Nefropatía lúpica	15	7; 47	21,88	2,33 - 205,78	0,007	
Vasculitis ANCA positivo	7	3; 43	18,75	1,54 - 277,78	0,021	

El síndrome nefrótico idiopático incluye la nefropatía por mínimos cambios, la glomeruloesclerosis segmentaria y focal, y la nefropatía IgM. La glomerulonefritis membranoproliferativa incluye tipos I, II y III.

En el grupo de pacientes con GNIM, la edad, la duración de la enfermedad renal, los niveles de enzimas hepáticas y los factores de riesgo para adquirir la infección por VHC fueron comparables entre los pacientes con y sin infección oculta por el VHC (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación de pacientes con y sin infección por el virus de la hepatitis C oculto en glomerulonefritis inmunomediadas.					
	glomerulonefritis inmunomediadas			P	nefropatía glomerular hereditaria
	VHC oculto positivo (n=34)	VHC oculto negativo (n=53)			
Edad (años; media ± DS)	51,6 ± 21,4	48,7 ± 16,7	0,502	47,6 ± 14,5	
Mujer (n; %)	12; 35	33; 62	0,014	20; 77	
Duración de la enfermedad renal (meses; media ± DS)	100,2 ± 103,9	106,1 ± 83,6	0,774	232,8 ± 99,5	
Creatinina sérica (mg/dl; media ± DS)	1,5 ± 0,9	1,1 ± 0,4	0,015	1,78 ± 2,3	
Aclaramiento de creatinina (ml/min 1,73 m ² ; media ± DS)	78,6 ± 38	93,2 ± 42,8	0,113	92,5 ± 47,7	
Cockcroft-Gault (ml/min; media ± DS)	73,7 ± 38	88,5 ± 37,2	0,096	86,4 ± 47,2	
Factores de riesgo de adquisición del VHC (n; %)	12; 35	13; 25	0,279	1; 4	
Aspartato aminotransferasa (IU/l; media ± DS)	22,1 ± 6,2	21 ± 5,2	0,377	21 ± 11,5	
Alanino aminotransferasa (UI/l; media ± DS)	20,4 ± 11	20 ± 9	0,825	20 ± 13,2	
Gamma Glutamil Transeptidasa (UI/l; media ± DS)	25,4 ± 12,8	34,6 ± 34,1	0,078	28,4 ± 35	

Factores de riesgo para la adquisición del VHC: transfusiones sanguíneas, tatuajes/piercing, contacto con portador crónico del VHC

Valores normales: Aspartato amino-transferasa <40 UI/l; Alanino amino transferasa < 40 UI/l; Gamma-glutamil-transpeptidasa <45 UI/l; Creatinina sérica ≤ 1,3 mg/dl; Cockcroft-Gault >90ml/min.

Los valores de P corresponden a la comparación de pacientes con GNIM con y sin infección por el VHC oculto.

Sin embargo, la frecuencia del sexo femenino fue significativamente menor (P =0,014) en el grupo de pacientes con VHC oculto (12/34: 35%) en comparación con el grupo negativo (33/53: 62%). Además, los pacientes con infección oculta por el VHC tenían niveles significativamente más altos de creatinina sérica en comparación con aquellos sin VHC oculta (1,5 ± 0,9 frente a 1,1 ± 0,4 mg / dl, P=0,015). Los datos registrados sobre la presencia de factor reumatoide solo estaban disponibles para 47 pacientes (19 de ellos con VHC oculta), siendo positivos en 1/19 (5%) casos con infección oculta por VHC y en 3/28 (11%) de aquellos sin HCV oculto (P=0,638). Las crioglobulinas solo se habían determinado en 11 pacientes (seis con y cinco sin infección oculta por el VHC) y todas eran negativas.

El análisis multivariado ajustado por sexo reveló un mayor riesgo de infección oculta por el VHC en el grupo de pacientes con GNIM (odds ratio: 1/4 13.29; intervalo de confianza del 95%: 1.695-104.229; P=0.014).

Después de 42,5 ± 8,5 meses de la entrada en el estudio, 81 pacientes con GNIM (30 con infección oculta por el VHC) seguían asistiendo a nuestras consultas de Nefrología. Los seis pacientes restantes (cuatro con VHC oculto) se perdieron para el seguimiento. Los niveles séricos de creatinina finales no difirieron significativamente entre los pacientes con y sin infección oculta por VHC (2,0 ± 1,9 frente a 1,4 ± 2,1 mg / dl, respectivamente), aunque el aclaramiento de creatinina fue significativamente menor (P=0,032) entre los pacientes con VHC oculto (68,2 ± 45,1 ml / min por 1.73 m²) que en

aquellos sin infección oculta ($89,7 \pm 39,6$ ml / min por 1.73 m²). Sin embargo, la tasa de disminución de la función renal fue comparable en ambos grupos (datos no mostrados). En relación con el resultado clínico, la frecuencia de la progresión de la enfermedad renal en etapa terminal tendió a ser mayor en pacientes con VHC oculta (5/30: 17%) en comparación con la de los negativos (2/51: 4%) pero no estadísticamente diferencia significativa ($P= 0,062$). Un total de 24 pacientes (siete con infección oculta por el VHC) dieron su consentimiento para volver a someterse a una prueba de ARN del VHC en CMSP y en suero después de ultracentrifugación. Esta detección del ARN del VHC también se realizó de forma ciega. Los 17 pacientes sin VHC oculta permanecieron ARN-VHC negativos, tanto en CMSP como en suero después de la ultracentrifugación. De los siete pacientes con VHC oculta, inicialmente, uno tenía ARN viral en el suero (después de la ultracentrifugación) y los otros seis pacientes tenían ARN-VHC positivo en CMSP. En la muestra de seguimiento, los siete pacientes fueron negativos al ARN del VHC en suero después de la ultracentrifugación. Sin embargo, se detectó ARN viral en las CMSP de los siete pacientes, lo que confirma la presencia de una infección oculta por el VHC.

Material y Metodos

Desde junio de 2009 hasta enero de 2012, se incluyeron en el estudio 87 pacientes con nefropatías glomerulares primarias y secundarias y 26 pacientes con nefropatía glomerular hereditaria. El diagnóstico de la enfermedad renal se basó en una biopsia renal, excepto en los casos de hematuria familiar benigna diagnosticada por datos clínicos y familiares. Todos los pacientes fueron anti-VHC negativos, así como antígeno de superficie de hepatitis B y anti-VIH negativo mediante pruebas comerciales de rutina (VITROS Anti-HCV Assay, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ; Enzygnost hepatitis B surface antigen 5.0 y Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz y se realizó según la Declaración de Helsinki. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de cada paciente.

Procedimientos de laboratorio:

Se tomaron muestras de sangre de todos los pacientes al momento de inicio del estudio. Al llegar la sangre al laboratorio, se obtuvieron muestras de suero de sangre coagulada, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80 °C, mientras que las CMSP se aislaron de sangre anticoagulada mediante centrifugación en gradiente de densidad Biocoll (Biochrom, Berlín, Alemania) y almacenado a -20 °C en solución RNAlater (Ambion, Austin, TX). La detección del ARN del VHC se realizó durante el período de inclusión

por personal de laboratorio que desconocía el estado clínico de los pacientes. Cada serie de PCR incluyó un número máximo de seis muestras junto con controles negativos (repetidamente sueros negativos al ARN del VHC y muestras de PBMC de cinco voluntarios sanos) y espacios en blanco de reactivo en los que se reemplazó el ARN total con agua de grado PCR. Todos los controles negativos se prepararon conjuntamente con las muestras y acompañaron a las muestras durante todo el proceso de PCR. Además, para evitar la contaminación por PCR, se observaron estrictamente las directrices de Kwok e Higuchi (37). Finalmente, todas las muestras positivas al ARN del VHC, así como las muestras negativas seleccionadas al azar, fueron nuevamente examinadas nuevamente en días diferentes por otra persona que desconocía los resultados de la PCR previa.

Detección de ARN del VHC:

Se extrajo el ARN total de 250 ml de suero usando Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), y después de la precipitación, el sedimento se disolvió en agua de dietil-pirocarbonato. Otros 2 ml del suero se ultracentrifugaron sobre un colchón de sacarosa al 10% a 100.000 μ g durante 17 h 4 °C. El sedimento se disolvió en 250 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mmol / l, EDTA 10 mmol / l, pH 7,5); el ARN total se aisló con Trizol LS Reagent (Invitrogen), se precipitó y el sedimento se disolvió en agua tratada con dietil-pirocarbonato. El ARN total de las CMSP se aisló con SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). Después de la precipitación, los gránulos se disolvieron en agua tratada con dietil-pirocarbonato y se determinó la concentración de ARN mediante espectrofotometría.

La detección de la región 5' no codificante de la cadena sentido ARN-VHC (usando 5 ml de ARN total aislado de 250 ml de suero o de 2 ml de suero ultracentrifugado, o utilizando 0,5 mg de ARN total de CMSP) y del VHC antisentido. La cadena de ARN (en CMSP) se realizó mediante una RT-PCR en tiempo real específica de cadena utilizando la enzima termoestable Tth para la síntesis del ADNc correspondiente a alta temperatura como se describe (22). La PCR en tiempo real se realizó con sondas FRET en un LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con 2 ml de ADNc en un volumen final de 20 ml, utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics), como se informó (22). Una curva estándar construida con diluciones de 10 veces de un Se usó ARN-VHC sintético de polaridad de sentido para la cuantificación de la cadena de ARN del VHC sentido en CMSP y en suero. Como se informó anteriormente, la sensibilidad de este ensayo fue de tres copias de ARN-VHC por reacción (22).

Análisis de secuenciación:

Para asegurar aún más la especificidad de los resultados, la amplificación parcial del gen del núcleo del VHC (302 nucleótidos) se realizó como se describe (21) en ARN total aislado de CMSP de siete pacientes seleccionados al azar con infección oculta por VHC y del suero, después de ultracentrifugación, de dos otros pacientes. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR II TOPO (Invitrogen) y los clones se secuenciaron automáticamente. Las secuencias de nucleótidos de los genotipos VHC 1-3 se obtuvieron de GenBank y se construyó un árbol filogenético mediante el método Neighbor-Joining utilizando la versión 4.0.38 del software MEGA. El conjunto de datos se remuestró 1000 veces para determinar el soporte para las principales ramas del árbol.

Análisis estadístico:

Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. Las variables continuas se compararon mediante la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney. Se realizó un análisis de regresión logística multivariada para determinar los factores asociados independientes de la ausencia o presencia de infección oculta por el VHC.

Discusión

Estudios previos han demostrado una asociación entre la infección por VHC y la glomerulonefritis (4-6). El diagnóstico de laboratorio de rutina de esta glomerulonefritis relacionada con el VHC se basa en la presencia de marcadores serológicos VHC convencionales (anti-VHC y ARN-VHC). Sin embargo, en los últimos años, se ha documentado la existencia de infección oculta por VHC (presencia de ARN viral en el hígado y en CMSP con anti-VHC indetectable y ARN-VHC sérico) en diferentes poblaciones, incluidos pacientes con hepatitis criptogénica, pacientes en hemodiálisis, y sujetos sanos sin evidencia de enfermedad hepática (21,23-29)

El objetivo de este trabajo fue investigar la prevalencia de la infección oculta por el VHC en pacientes con GNIM con anticuerpos anti-VHC y ARN-VHC séricos. Hemos encontrado que el 39% de estos pacientes tenían una infección oculta por el VHC, como lo demuestra la detección de ARN-VHC en CMSP o en suero después de la ultracentrifugación. Los resultados de la PCR se consideraron fiables porque (i) el gran número de controles negativos incluidos en cada ciclo de PCR siempre fue negativo, (ii) el personal de laboratorio desconocía el estado clínico de los pacientes y diferentes operadores obtuvieron resultados idénticos al probar las muestras en días diferentes, y (iii) los resultados del análisis filogenético realizado después de la amplificación de la

región del núcleo del VHC, que era una región diferente a la amplificada para la evaluación del ARN del VHC (el 5' no codificante región) en todas las muestras incluidas en el estudio. Finalmente, se confirmó la presencia de infección oculta por VHC al repetir la detección de ARN-VHC en muestras recolectadas $42,5 \pm 8,5$ meses después de las iniciales.

La prevalencia de infección oculta por VHC en pacientes con GNIM (39%) fue significativamente mayor ($P= 0,001$) que la encontrada en el grupo de pacientes con GNH (3,8%). Además, el análisis multivariado mostró que el riesgo de tener una infección oculta por el VHC era 13 veces mayor para los pacientes con GNIM en comparación con GNH, por lo que todos estos datos sugieren que la infección oculta por VHC está claramente asociada con enfermedades glomerulares.

En pacientes con nefropatías glomerulares clásicas asociadas al VHC, la patogenia de la lesión renal está relacionada con la deposición de complejos inmunes del VHC en los glomérulos (7-9). Estos complejos inmunes pueden ser captados por células mesangiales, donde el ARN viral puede desencadenar la producción de interferones y citoquinas proinflamatorias a través de mecanismos dependientes e independientes del receptor Toll-like (30,31). Los pacientes con infección oculta por VHC no tienen anticuerpos anti-VHC detectables ni ARN-VHC detectable por métodos convencionales y, por lo tanto, podría argumentarse que el VHC oculto la infección no tiene un papel en la lesión renal de nuestros pacientes estudiados. Sin embargo, se ha informado que en un paciente con glomerulonefritis anti-VHC positivo pero negativo al VHC-ARN sérico durante años, la lesión renal probablemente sea inducida por virus debido a la presencia de antígeno VHC-NS3 en el tejido renal de el paciente (32). Además, un trabajo reciente describe la detección de antígenos del VHC y la visualización de partículas del VHC en el tejido renal del 1,8% de los pacientes con glomerulonefritis negativos al VHC, aunque no se proporciona el estado del ARN del VHC en suero o PBMC (33). Este porcentaje de VHC oculto es menor que el encontrado en nuestro estudio, pero se debe considerar que la inmunohistoquímica es una técnica menos sensible que la detección de ARN-VHC. Por lo tanto, tomando en conjunto todos estos datos reportados anteriormente y nuestros resultados, se puede suponer que la infección oculta por VHC puede ser la causa subyacente de una proporción de nefropatías glomerulares primarias y secundarias con marcadores serológicos virales negativos. Aunque en el presente trabajo no se realizó inmunohistoquímica o detección virológica en las biopsias renales (ya que no se disponía de material adecuadamente almacenado), nuestros datos sugieren un posible papel patogénico directo de la infección oculta por VHC en el daño renal. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que los pacientes con GNIM con infección oculta por el VHC tenían una función renal significativamente peor (niveles de

creatinina sérica y valores de aclaramiento de creatinina) que los pacientes con GNIM sin VHC oculto. Aunque la tasa de disminución de la función renal fue similar entre ambos grupos, la frecuencia de progresión a enfermedad renal terminal tendió a ser mayor en pacientes con VHC oculto que en los negativos, lo que indica que el VHC oculto puede ser un factor pronóstico negativo, como ocurre con la infección clásica de hepatitis C en pacientes con GNIM (34). Finalmente, la infección oculta por VHC podría explicar por qué el tratamiento con interferón es beneficioso, induciendo respuestas clínicas y de laboratorio, en algunos pacientes negativos al VHC con crioglobulinemia mixta esencial (35,36). Por lo tanto, la detección de la infección oculta por el VHC proporciona la base racional para la administración de terapia antiviral en nefropatías glomerulares anti-VHC negativas.

Conclusiones

En resumen, la infección oculta por el VHC puede estar involucrada en la patogénesis de una proporción significativa de GNIM, pero se deben realizar más estudios y un seguimiento a largo plazo de estos pacientes para confirmar las implicaciones clínicas y patológicas de este hallazgo.

Bibliografía

1. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 1017–1029.
2. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; 44: 5–22.
3. Rodríguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J et al. Hepatitis C virus RNA in kidney biopsies from infected patients with renal diseases. *J Viral Hepat* 2000; 7: 23–29.
4. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 465–470.
5. Latt N, Alachkar N, Gurakar A. Hepatitis C virus and its renal manifestations: a review and update. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2012; 8: 434–445.
6. Kamar N, Izopet J, Alric L et al. Hepatitis C virus-related kidney disease: an overview. *Clin Nephrol* 2008; 69: 149–160.
7. Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 227–236.

8. Barsoum RS. Hepatitis C virus: from entry to renal injury—facts and potentials. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1840–1848.
9. Sansonno D, Lauletta G, Nisi L et al. Non-enveloped HCV core protein as constitutive antigen of cold-precipitable immune complexes in type II mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 275–282.
10. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335–1374.
11. Chamie G, Bonacini M, Bangsberg DR et al. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 577–583.
12. Hadlich E, Alvares-Da-Silva MR, Dal Molin RK et al. Hepatitis C virus (HCV) viremia in HIV-infected patients without HCV antibodies detectable by third-generation enzyme immunoassay. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1506–1509.
13. Schneeberger PM, Keur I, van Loon AM et al. The prevalence and incidence of hepatitis C virus infections among dialysis patients in the Netherlands: a nationwide prospective study. *J Infect Dis* 2000; 182: 1291–1299.
14. Hanuka N, Sikuler E, Tovbin D et al. Hepatitis C virus infection in renal failure patients in the absence of anti-hepatitis C virus antibodies. *J Viral Hepat* 2002; 9: 141–145.
15. Schmidt WN, Wu P, Cederna J et al. Surreptitious hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. *J Infect Dis* 1997; 176: 27–33.
16. Zanetti AR, Tanzi E, Zehender G et al. Hepatitis C virus RNA in symptomless donors implicated in post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 336: 448.
17. Villa E, Ferretti I, De Palma M et al. HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in post-transfusion hepatitis (PTH). *J Hepatol* 1991; 13: 256–259.
18. Brojer E, Gronowska A, Medyn'ska J et al. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004; 44: 1706–1710.
19. Challine D, Pellegrin B, Bouvier-Alias M et al. HIV and hepatitis C virus RNA in seronegative organ and tissue donors. *Lancet* 2004; 364: 1611–1612. Tugwell BD, Patel PR, Williams IT et al. Transmission of hepatitis C virus to several organ and

- tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann Intern Med* 2005; 143: 648–654.
20. Castillo I, Pardo M, Bartolome´ J et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004; 189: 7–14. Bartolome´ J, Lo´pez-Alcorocho JM, Castillo I et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol* 2007; 81: 7710–7715.
 21. Bokharaei-Salim F, Keyvani H, Monavari SH et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. *J Med Virol* 2011; 83: 989–995. Keyvani H, Bokharaei-Salim F, Monavari SH et al. Occult hepatitis C virus infection in candidates for liver transplant with cryptogenic cirrhosis. *Hepat Mon* 2013; 13: e11290.
 22. Hernandez BY, Zhu X, Kwee S et al. Viral hepatitis markers in liver tissue in relation to serostatus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22: 2016–2023. Farahani M, Bokharaei-Salim F, Ghane M et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with lymphoproliferative disorders. *J Med Virol* 2013; 85: 235–240.
 23. Barril G, Castillo I, Arenas MD et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2288–2292. De Marco L, Gillio-Tos A, Fiano V et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One* 2009; 4: e8128.
 24. De Marco L, Manzini P, Trevisan M et al. Prevalence and follow-up of occult HCV infection in an Italian population free of clinically detectable infectious liver disease. *PLoS One* 2012; 7: e43541. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG et al. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1986–1996.
 25. Wo´rnle M, Schmid H, Banas B et al. Novel role of Toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2006; 168: 370–385. Bataille S, Kaplanski G, Boucraut J et al. Membranoproliferative glomerulonephritis and mixed cryoglobulinemia after hepatitis C virus infection secondary to glomerular NS3 viral antigen deposits. *Am J Nephrol* 2012; 35: 134–140.
 26. Kong D, Wu D, Wang T et al. Detection of viral antigens in renal tissue of glomerulonephritis patients without serological evidence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Int J Infect Dis* 2013; 17: e535–e538. Perico N, Cattaneo

- D, Bikbov B et al. Hepatitis C infection and chronic renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 207–220.
27. Casato M, Lagana B, Pucillo LP et al. Interferon for hepatitis C virus- negative type II mixed cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1998; 338: 1386–1387. Casato M, Lilli D, Donato G et al. Occult hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinaemia. *J Viral Hepat* 2003; 10: 455–459. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339: 237–238.
28. Tamura K, Dudley J, Nei M et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Bio Evol* 2007; 24: 1596–1599.

CAPITULO 4: NEFROPATÍA ASOCIADA A DIABETES MELLITUS E INFECCIÓN OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Resumen

Introducción y objetivos: Estudios previos refieren una alta prevalencia de infección por el VHC en pacientes con ND. Sin embargo, se desconoce la epidemiología y la relación entre la ND y la infección oculta por el VHC. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de infección oculta por el VHC en una población sin marcadores convencionales de infección por VHC diagnosticados de ND, y estudiar sus posibles implicaciones clínicas.

Materiales y métodos: Se incluyeron en el estudio 125 pacientes adultos con ND negativos frente a VHC y VHC-ARN sérico para determinar la presencia de infección por el VHC oculto. El ARN del VHC fue determinado mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real en CMSP y en 2 ml de plasma después de la ultracentrifugación.

Resultados: La infección por el VHC oculto fue positiva en 10 pacientes (8%). Los pacientes con VHC oculto positivos tenían niveles de ferritina significativamente mayores ($p = 0,002$) y gammapatía monoclonal (30% [3/10] frente a 0,87% [1/115] que los pacientes sin VHC oculto [$p = 0,003$]). Encontramos niveles similares de AST y GGT en plasma y control de la diabetes (HbA1C) en ambos grupos. Al final del seguimiento, la tasa de progresión de la enfermedad renal tendió a ser más rápida en el grupo con VHC oculto positivo en relación con el grupo negativo, pero sin una diferencia significativa. No encontramos una asociación entre VHC oculto y morbilidad cardiovascular.

Conclusión: Hubo una prevalencia del 8% de VHC oculto en pacientes con insuficiencia renal crónica secundaria a ND, más alta que en la población general. Esta infección oculta no parece desempeñar un papel en el control de la diabetes, el riesgo cardiovascular o la esteatosis. Sin embargo, en el grupo con VHC oculto positivo, la tasa de progresión de la enfermedad renal tendió a ser más rápida que en el grupo negativo, y la incidencia de gammapatía monoclonal asociada fue significativa.

1. Introducción

La DM tipo 2 y el VHC son dos de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. Estudios anteriores han demostrado una alta prevalencia de infección por VHC en pacientes con ND [1, 2]. La asociación entre estas dos enfermedades es un tema de controvertido [3]. Por un lado, esta asociación está respaldada por dos metanálisis [4,5], estudios longitudinales y mecanismos fisiopatológicos descritos según los cuales la infección por VHC causa RI [6-10]. Ambas entidades comparten complicaciones metabólicas como RI, hígado graso, inflamación subclínica y tal vez enfermedad cardiovascular, lo que resulta en un aumento significativo en la morbilidad y la mortalidad prematura [3]. Por otro lado, un reciente estudio de cohortes que incluyó 15.128 pacientes estadounidenses (NHANES) ha desafiado este dogma porque encontró que la prevalencia de diabetes o prediabetes no estaba asociada con el estado de infección por el VHC [11].

La infección oculta por VHC se caracteriza por la presencia de ARN-VHC en el hígado o en CMSP en ausencia de marcadores serológicos [12]. Estudios complementarios han demostrado que la infección por el VHC oculto también puede diagnosticarse mediante la concentración de 2 ml de suero por ultracentrifugación, seguida de detección de ARN-VHC mediante PCR en tiempo real [13]. La infección por el VHC oculto, como un estado de infección por VHC no aparente pero real, podría explicar estas diferencias entre la infección por VHC y la DM tipo 2. Además, nuestro grupo ha demostrado una asociación entre infección oculta por el VHC y un amplio espectro de enfermedades glomerulares mediadas por mecanismos inmunes, incluido un papel en la progresión de la enfermedad [14].

Por esta razón, hemos intentado comprender mejor las implicaciones epidemiológicas y clínicas de la infección por el VHC oculto en una población de DM tipo 2 y ND. También revisamos la progresión de la ND según el estado de la infección por el VHC oculto y su asociación con esteatosis, control de la diabetes y complicaciones cardiovasculares.

2. Materiales y métodos

Este estudio prospectivo incluyó 125 pacientes adultos que visitaban el Servicio de Nefrología debido a ND entre 2012 y 2013. La diabetes se definió utilizando los criterios estándar de la American Diabetes Association, y se confirmó mediante pruebas de laboratorio. La ND se caracterizó como diabetes a largo plazo con albuminuria (relación de albúmina a creatinina > 30 mg / g), función renal alterada, filtrado glomerular [FG] <60 ml / minuto por 1.73 m²), o ambas. Otras nefropatías fueron descartadas por un nefrólogo experto. Todos los pacientes incluidos fueron negativos para anti-VHC,

antígeno de superficie de hepatitis B y anti-VIH utilizando una prueba comercial de rutina (INVITROS Anti-HCV Assay, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ; Enzygnost hepatitis B antígeno de superficie 5.0 y Enzygnost Anti-HIV ½ Plus Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario La Paz y se realizó según la Declaración de Helsinki. Cada paciente proporcionó el consentimiento informado por escrito y luego se realizó una prueba de infección oculta por el VHC. Se realizó un seguimiento promedio de $17,5 \pm 9$ meses para explorar los resultados de la función renal y la incidencia de complicaciones cardiovasculares. Los parámetros demográficos, epidemiológicos, clínicos y de laboratorio de los 125 pacientes con ND a los que se les determinó la presencia de infección para el VHC oculto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los pacientes en el momento de inclusión	
Edad (años; media \pm DS)	73,7 \pm 10,04
Varón (n; %)	115; 92
Tipo de diabetes : (n;%)	
I	10; 8
II	115; 92
Factores de riesgo para la adquisición del VHC : (n; %)	
Trasfusión sanguínea previa	35; 28
Tatuaje/ drogadicción	2; 1,6
Contacto con portador crónico del VHC	2; 1,6
Infección por el VHB	9; 15
ALT (UI/l; media \pm DS)	24,3 \pm 23,4
AST (UI/l; media \pm DS)	43,2 \pm 42
GGT (UI/l; media \pm DS)	47,8 \pm 66,7
Creatinina sérica (mg/dl; media \pm DS)	1,91 \pm 0,83
Aclaramiento de creatinina (ml/min 1,73 m ² ; media \pm DS)	44,2 \pm 26,8
Proteinuria (g/24 h; media \pm DS)	1,24 \pm 1,86

VHB: virus de la hepatitis B; ALT: alanin aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamil-transpeptidasa. N/D: No disponible.

La hematuria se definió como un recuento de glóbulos rojos mayor que 5 por campo de alta sensibilidad en el sedimento urinario. Los valores de circunferencia de la cintura se consideraron normales fueron: ≤ 102 cm para los hombres y ≤ 88 cm para las mujeres. Las transfusiones sanguíneas previas, los procedimientos quirúrgicos, los contactos en el hogar y las parejas diagnosticadas con infección crónica por el VHC, así como la presencia de un tatuaje o piercing se registraron como posibles factores de riesgo de infección por el VHC.

Detección de ARN del VHC:

Se aislaron CMSP a partir de muestras de sangre anticoaguladas recogidas de todos los pacientes en el momento de la inclusión en el estudio. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 ° C y las CMSP a -20 ° C en solución RNAlater (Ambion, Austin, TX) hasta la detección del ARN del VHC.

Dos mililitros de plasma fueron ultracentrifugados sobre un colchón de sacarosa al 10% durante 17 h a 100.000 x gy 4 ° C para concentrar partículas de VHC [13]. El sedimento se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5). El ARN total se aisló con el reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA), luego se precipitó, y el sedimento de ARN se disolvió en agua tratada con dietil-pirocarbonato. El ARN total de las CMSP se aisló con SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). Después de la precipitación, los gránulos se disolvieron en agua tratada con dietil-pirocarbonato, y la concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría.

La detección de ARN-VHC se realizó utilizando 5 µl de ARN total aislado de 2 ml de plasma ultracentrifugado o utilizando 0,5 µg de ARN total de CMSP mediante RT-PCR con la enzima Tth para la síntesis de ADNc. como se describe [13]. PCR en tiempo real se realizó con FRET sondas en un LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con 2 µl de cDNA en un volumen final de 20 µl, utilizando el LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics), como se informó [13]. Para la cuantificación del ARN del VHC, se utilizó una curva estándar construida con diluciones al 10% de un ARN del VHC sintético. La sensibilidad de este ensayo fue de tres copias de ARN-VHC por reacción [13].

Se incluyeron controles negativos (plasma negativo de VHC-ARN negativo repetido y muestras de CMSP de cuatro voluntarios sanos) y blancos de reactivo, en los que se reemplazó el ARN total con agua de grado PCR, en cada ciclo de PCR. Todos estos controles negativos se prepararon con las muestras y acompañaron a las muestras durante todo el proceso de RT-PCR.

Análisis estadístico:

las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. Las variables continuas se compararon mediante la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney.

3. Resultados

De los 125 pacientes estudiados, 7 dieron positivo para la presencia de ARN-VHC en CMSP, con una concentración mediana de copias de ARN-VHC de 1980 por µg de ARN total (rango 110-4820). Además, se detectó el ARN del VHC en el plasma después de

la ultracentrifugación de 2 ml de plasma en otros tres pacientes a concentraciones de 120, 135 y 140 copias de ARN del VHC por ml de plasma. Ningún paciente fue simultáneamente positivo para el ARN del VHC en las CMSP y en el plasma después de la ultracentrifugación. Por lo tanto, encontramos una prevalencia de infección por el VHC oculto en nuestra serie de 10/125 (8%); estos pacientes tenían ARN viral detectable en CMSP o en plasma después de la ultracentrifugación a pesar de la ausencia de anticuerpos anti-VHC.

La Tabla 2 muestra las características demográficas, clínicas y los factores de riesgo cardiovascular de los dos grupos de pacientes con ND según la presencia o no de infección oculta por el VHC.

Tabla 2: Parámetros demográficos, clínicos y analíticos dependiendo de la infección por VHC oculto positivo /negativo.

	VHC oculto negativo (n=115)	VHC oculto positivo (n=10)	Significación
Edad (años; media ± DS)	73,7 ± 10	74,9 ± 8,6	0,768
Varón (n; %)	78; 70,9	60; 61,3	0,613
Factores de riesgo para la adquisición del VHC (%)	1,4	1,1	0,519
Fumador (n; %)	7; 11,8	2; 9,5	0,595
Presión arterial sistólica (mm Hg; media ± DS)	134,6 ± 12,1	135,5 ± 22,6	0,083
Presión arterial diastólica (mm Hg; media ± DS)	64,0 ± 17,9	66,8 ± 10,9	0,369
IMC (kg/m ²)	31,7 ± 6,.	30,8 ± 6	0,708
Circunferencia cintura (cm; media ± DS)	114,5 ± 13,3	107,1 ± 14	0,871
Colesterol total (mg/dl; media ± DS)	140,4 ± 27,1	147,6 ± 33,1	0,206
HbA1C (%; media ± DS)	7,1 ± 1,31	6,6 ± 0,70	0,58
Infarto de miocardio (n; %)	23; 20,9	2; 20	0,254
Accidente cerebro-vascular (n; %)	12; 10,9	1; 10	0,701

VHC: hepatitis C virus; IMC: índice de masa corporal; HbA1c: hemoglobina glicosilada. N/D: No disponible.

La mayoría de las variables fueron similares. Al comienzo del seguimiento, los niveles plasmáticos de enzimas hepáticas, la función renal y la proteinuria fueron los mismos para ambos grupos; sin embargo, se demostró un nivel de ferritina plasmática significativamente mayor (media \pm DS; 325;8 \pm 194,4 ng / ml) en pacientes con infección VHC oculta positiva (los pacientes VHC oculto negativo mostraron 139,1 \pm 136,8 ng / ml; p = 0.002). El número de pacientes que informaron factores de riesgo para la adquisición de la infección por el VHC (transfusiones de sangre, tatuajes o piercings, o contactos en el hogar con un portador crónico del VHC) fue similar en ambos grupos. Al final del seguimiento (media \pm DS; 17,5 \pm 9 meses), no hubo diferencias en los niveles plasmáticos de enzimas hepáticas, control de la diabetes, eventos cardiovasculares (IAM o ACVA), función renal y proteinuria, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros de laboratorio renales y hepáticos al final del seguimiento dependiendo de la infección por el VHC oculto positivo/ negativo

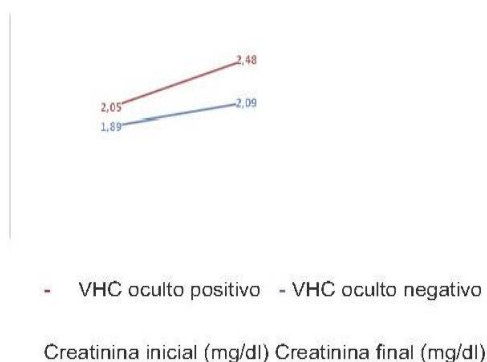
	VHC oculto positivo (n=115)	VHC oculto negativo (n=10)	Significación
Creatinina sérica (mg/dl; media \pm DS)	2,1 \pm 1,1	2,5 \pm 1,1	0,282
ClCr (ml/min por 1.73 m ² ; media \pm DS)	42,4 \pm 23,4	28,8 \pm 15	0,076
Proteinuria (g/24h; media \pm DS)	1,3 \pm 1,8	0,5 \pm 0,5	0,179
Hematuria (n; %)	13; 11,8	1; 1	0,67
ALT (U/l; media \pm DS)	22,1 \pm 11,4	16,6 \pm 4,5	0,136
GGT (U/l; media \pm DS)	50,9 \pm 39,9	29,2 \pm 24,2	0,271
Ferritina (ng/ml; media \pm DS)	150,2 \pm 130,8	163,2 \pm 81,4	0,02*

ClCr: aclaramiento de creatinina; ALT: alanil-aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa, N/D: No disponible.

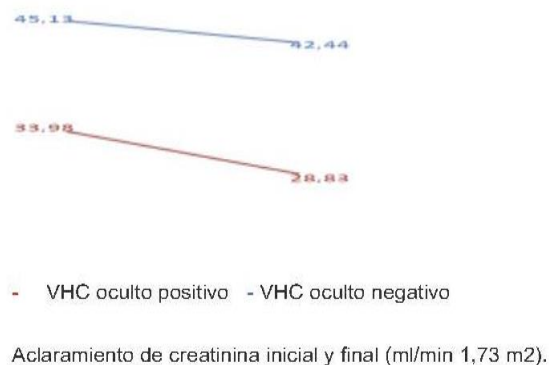
Aunque no hubo diferencias significativas en los parámetros hepáticos y renales, la tasa de disminución de la función renal tendió a ser más rápida en el grupo con infección por el VHC oculto, como lo demuestran los valores plasmáticos de creatinina y aclaramiento (Figura 1). No identificamos una asociación entre infección oculta por VHC y morbilidad cardiovascular, pero curiosamente, encontramos que los pacientes con infección oculta por VHC tenían una incidencia de 30% (3/10) de gammapatía monoclonal vs. 0,87% (1/115) de pacientes sin VHC oculto ($p = 0,003$), durante el seguimiento.

Figura 1: Evolución de la función renal en pacientes según VHC oculto positivo/negativo. (A) Niveles de creatinina plasmática inicial y final (mg/dl). (B) Aclaramiento de creatinina inicial y final (ml/min 1,73 m²).

(A) Progresión de la función renal.



(B) Aclaramiento de creatinina inicial y final (ml/min 1,73 m²).



4. Discusión

La infección por el VHC oculto es una situación caracterizada por la ausencia de marcadores serológicos y la presencia de ARN del VHC en el hígado o en CMSP. La presencia de VHC oculto ha sido documentada en diversas poblaciones, incluidos pacientes con GNIM, hepatitis criptogénica, hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) y trastornos linfoproliferativos, así como aquellos sometidos a hemodiálisis, pacientes infectados por VIH, usuarios de drogas y la población sana [12].

Estudios previos de nuestro grupo habían informado una alta prevalencia de infección oculta por el VHC en grupos de pacientes con ERC (hemodiálisis 45%, GNIM 39%) [14, 15]. La prevalencia de anti-VHC en España es del 1,7% (0,4% -2,6%) [16]. Se sabe que la infección por VHC detectada por los marcadores serológicos convencionales es altamente prevalente en pacientes con ND, alcanzando el 19.5% [17,18]. Sobre estas bases, este estudio prospectivo tuvo como objetivo determinar la prevalencia de infección por el VHC oculto y las posibles implicaciones clínicas en una población de pacientes con ND.

La prevalencia de infección por el VHC oculto encontrada en pacientes con ND en nuestro estudio fue del 8%, como lo demuestra la detección de ARN-VHC en CMSP o en plasma después de la ultracentrifugación, más alta que la encontrada en el grupo con GNH (3.8%) [14]. En nuestro estudio, los factores de riesgo para la infección por el VHC fueron mayores que los encontrados previamente en las GNH (4%) y menores que los descritos en la GNIM.

La infección crónica por VHC está asociada de manera reconocible a la esteatosis hepática [19]. Tanto el VHC como el síndrome metabólico son trastornos frecuentes y existe la posibilidad de superposición. No encontramos diferencias en los parámetros hepáticos de acuerdo con la presencia de infección por el VHC oculto. El único parámetro que encontramos diferencias significativas fue la ferritina sérica, que podría reflejar la inflamación hepática.

Se alentó a los pacientes con sobrepeso a alcanzar el peso ideal porque la pérdida de peso reduce la esteatosis hepática y la albuminuria y mejora la función renal en pacientes con diabetes [20]. Para la mayoría de los pacientes, los objetivos de la HbA1C fueron $\leq 7,0\%$ para evitar comorbilidades diabéticas. Aunque el IMC y la circunferencia de cintura tendieron a ser más altos en el grupo de infección por VHC oculto positivo, no encontramos diferencias significativas en el requerimiento de insulina HbA1C para ninguno de los grupos.

Si el VHC es un factor de riesgo independiente para los trastornos cardiovasculares sigue siendo controvertido [19]. La presencia de infección por VHC aumentó el riesgo de enfermedad arterial coronaria en varios estudios [21-27]. Además, dos estudios basados en la comunidad encontraron que la infección por VHC era un predictor independiente de muerte cerebrovascular, y también observaron una asociación entre los niveles séricos de ARN del VHC y la mortalidad cerebrovascular, lo que sugiere un mecanismo de dosis-efecto [28]. Otros estudios, sin embargo, no han podido identificar una asociación entre la infección por VHC y la morbilidad cardiovascular [29-30]. No identificamos una asociación entre infección por el VHC oculto y morbilidad cardiovascular, pero encontramos que los pacientes con infección por el VHC oculto

positivo tenían una incidencia de 30% (3/10) de gammapatía monoclonal frente a 0,87% (1/115) de los pacientes sin ella ($p = 0,003$). La incidencia de infección por VHC y otras neoplasias no hepáticas se examinó en una cohorte sueca de pacientes infectados con el VHC. El estudio mostró que el riesgo de linfoma no Hodgkin de células B y de mieloma múltiple aumentó significativamente [31]. La presencia de infección por el VHC oculto positivo también se ha descrito en pacientes con trastornos linfoproliferativos, con una prevalencia entre 1,9% y 20% [32-33]. Otro estudio informó que el antígeno VHC-NS3 se expresa con frecuencia en los ganglios linfáticos de pacientes con linfoma no Hodgkin negativo y anti-VHC y VHC sérico, sugiriendo la posibilidad de VHC oculto positivo en estos pacientes [34]. Aunque estos hallazgos aún no se han confirmado, sugieren que la infección por VHC podría ser importante en la patogénesis del trastorno linfoproliferativo postrasplante y otras neoplasias malignas hematológicas. El linfotropismo de este virus podría explicar la relación entre la infección por el VHC y algunos trastornos linfoproliferativos, particularmente la crioglobulinemia mixta y el linfoma no Hodgkin de células B [35]. En nuestra cohorte, es difícil establecer una conexión entre, VHC oculto positivo, ND y gammapatía monoclonal, particularmente dado el pequeño número de pacientes con VHC oculto positivo; pero la notable incidencia (30%) sugiere nuevas áreas para la investigación.

Las manifestaciones clínicas primarias de la ND son la albuminuria, ocasionalmente la hematuria microscópica y, en muchos pacientes, la enfermedad renal progresiva [36-38]. No encontramos una mayor prevalencia de hematuria en el grupo VHC oculto positivo. Al final del período de seguimiento, la progresión de la ERC tendió a ser más rápida en el grupo con infección oculta por el VHC; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. La proteinuria fue similar en ambos grupos, al igual que el uso de la terapia antiproteinúrica. Nuestro grupo también ha descrito la tendencia de los pacientes con GNIM e infección por el VHC oculto positivo a progresar a ERC terminal más rápidamente que los pacientes con VHC oculto negativos. [14].

Una de las limitaciones de nuestro estudio es el tamaño de la serie. Sin embargo, las tendencias que son complementarias con hallazgos previos justifican un reconocimiento preliminar de estas asociaciones, específicamente las relacionadas con la progresión más rápida de la ERC en pacientes con VHC oculto positivo.

5. Conclusión

En conclusión, en pacientes con ERC secundaria a ND, existe una menor prevalencia (8%) de infección por el VHC oculto positivo en comparación con la prevalencia en pacientes con GNIM (39%), pero más alta que en la población general y en las NGH [14]. Estos datos indican que la presencia de infección por el VHC oculto juega un papel

limitado en el control de la DM, el riesgo cardiovascular o la esteatosis hepática en estos pacientes. En el grupo con VHC oculto positivo, sin embargo, la progresión de la enfermedad renal tendió a ser más rápida que en el grupo negativo y mostró una prevalencia notable e inesperada de gammapatía monoclonal.

Bibliografía

- 1 Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R , Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19: 998-1000.
- 2 Jadoon NA, Shahzad, MA, Yaqood R. et al. Seroprevalence of hepatitis C in type 2 diabetes: evidence for a positive association. *Virol J* 2010; 7: 304-309.
- 3 Cusi K. The relationship between hepatitis C virus infection and diabetes: time for a divorce? *Hepatology* 2014; 60:1121-3.
- 4 White DL, Ratzin V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008; 49:831-44.
- 5 Naing C, Mak JW, Ahmed SI, Maung M. Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes mellitus: meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; 18:1642-51.
- 6 Eslam M, Khattab MA, Harrison SA . Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story. *Gut* 2011; 60: 1139-1151.
- 7 Kawaguchi Y, Mizuta T . Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2088-2901.
- 8 Kawaguchi T, Yoshida T , Harada M , Hisamoto T , Nagao Y Ide T , et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of supresor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165: 1499-1508.
- 9 Persico M, Russo R , Persico E , Svelto M , Spano D, Andolfo I , et al. SOCS3and IRS -1 gene expression differences between genotype 1 and genotype 2 hepatitis virus infected HepG2 cells. *Clin Chem Lab Med* 2009;47: 1217-25.
- 10 Paziienza V, Vinciguerra M, Andriulli A , Mangia A . Hepatitis C virus core protein genotype 3^a increases SOCS7 expression through PPAR-c in Huh-7 cells. *J Gen Virol* 2010; 91: 1678-1686.
- 11 Ruhl CE, Menke A , Cowie CC , Everhart JE .Relationship of hepatitis C virus infection with diabetes in the U.S. population. *Hepatology* 2014; 60: 1139-49.

- 12 Carreño V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications. *J Clin Virol* 2014; 61:315-320.
- 13 Bartolome J , Lopez-Alcorocho , Castillo I , Rodriguez-Iñigo E , Quiroga JA , Palacios R , et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81: 7710-5.doi:10.1128/JVI.02750-06.
- 14 Castillo I, Martinez-Ara J , Olea T , Bartolome J , Madero R , Hernandez E, et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 2014; 86: 619-24.
- 15 Barril G, Castillo I , Arenas MD , Espinosa M , Garcia-Valdecasas J, Garcia-Fernández N , et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19:2288–2292.
- 16 Gower E , Estes C , Blach S , Razavi-Shearer K , Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 61:S45-S57.
- 17 Crook ED , Penumalee S , Gavini B , Filippova K . Hepatitis C is a predictor of poorer renal survival in diabetic patients. *Diabetes Care* 2005; 28: 2187-91.
- 18 Soma J , Saito T , Taguma Y , Chiba S , Sato H, Sugimura K , et al. High Prevalence and Adverse Effect of Hepatitis C Virus Infection in Type II Diabetic-Related Nephropathy. *J Am Nephrol Soc* 2000; 11: 690-699.
- 19 Negro F . Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol* 2014; 61: S69-S78.
- 20 E. Morales, Valero MA , Leon M , et al. Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *Am J Kidney Dis* 2003; 41; 319.
- 21 Vassalle C, Masini S , Bianchi F , Zucchelli GC .Evidence for association between hepatitis C virus seropositivity and coronary artery disease. *Heart* 2004;90:565–566.
- 22 Alyan O, Kacmaz F , Ozdemir O , Deveci B , Astan R , Celebi AS , et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J* 2008;72:1960–1965.
- 23 Marelli D, Bresson J, Laks H , Kubak B , Fonarow G , Tsai FC, et al. Hepatitis C positive donors in heart transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2:443– 447.

- 24 Haji SA, Starling RC, Avery RK , Mawhorter S , Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Donor hepatitis-C seropositivity is an independent risk factor for the development of accelerated coronary vasculopathy and predicts outcome after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:277–283.
- 25 Younossi ZM, Braun WE , Protiva DA , Gifford Jr RW, Straffon RA . Chronic viral hepatitis in renal transplant recipients with allografts functioning for more than 20 years. *Transplantation* 1999; 67:272–275.
- 26 Butt AA, Xiaoqiang W, Budoff M , Leaf D , Kuller LH , Justice AC. Hepatitis C virus infection and the risk of coronary disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49:225–232.
- 27 Younossi ZM, Stepanova M, Nader F , Younossi Z , Elsheikh E . Associations of chronic hepatitis C with metabolic and cardiac outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37:647–652.
- 28 Lee MH, Yang HI, Wang CH, Jen CL , Yeh SH , Liu CJ, et al. Hepatitis C virus infection and increased risk of cerebrovascular disease. *Stroke* 2010; 41:2894–2900.
- 29 Völzke H, Schwahn C, Wolff B , Mentel R , Robinson DM, Kleine V , et al. Hepatitis B and C virus infection and the risk of atherosclerosis in a general population. *Atherosclerosis* 2004; 174: 99–103.
- 30 Arcari CM , Nelson KE , Netski DM , Nieto FJ , Gaydos CA. No association between hepatitis C virus seropositivity and acute myocardial infarction. *Clin Infect Dis* 2006; 43: e53–e56.
- 31 Kristiansen MG, Løchen ML , Gutteberg TJ , Mortense L , Eriksen BO , Florholmen J . Total and cause-specific mortality rates in a prospective study of community-acquired hepatitis C virus infection in northern Norway. *J Viral Hepat* 2011; 18: 237–244.
- 32 Youssef SS, Nasr AS , El Zanaty T , El Rawi RS , Mattar MM . Prevalence of occult hepatitis C virus in Egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat Res Treat* 2012; 2012; 429784.doi: 10.1155/2012/429784.
- 33 Maryam Farahan i, Farah Bokharaei- Salim, Masood Ghane, Alii Basi, Parisa Meysami and Hossein Keyvani. Prevalence of Occult Hepatitis C Virus Infection in Iranian Patients With Lymphoproliferative Disorders. *J Med Virol* 2013; 85 (2):235-40.
- 34 Ghada Mohamed El-sayed , Waleed Seif El-din Mohamed , Mohamed Akram Nouh , Manar Mohamed Moneer and Hadir Ahmed El-Mahallawy . *Viral Genomes and*

Antigen Detection of Hepatitis B and C Viruses in involved Lymph Nodes of Egyptian Non-Hodgkin's Lymphoma Patients. Egypt J Immunol 2006;13 (1):105-14.

35 Pena LR, Nand S , De Maria N , Van Thiel DH . Hepatitis C virus infection and lymphoproliferative disorders. Dig Dis Sci 2000; 45: 1854-1860.

36 Matsumura N, Hanatani M , Nishino T . The clinic-pathological significance of hematuria in diabetics. Nihon Jinzo Gakkai Shi 1994; 36: 1036.

37 O'Neill WM, Wallin JD , Walker PD . Hematuria and red cell casts in typical diabetic nephropathy. Am J Med 1983; 74: 389.

38 Lopes de Faria JB , Moura LA , Lopes de Faria SR .Glomerular hematuria in diabetics. Clin Nephrol 1988; 30: 117.

CAPITULO 5: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS EN EL TRASPLANTE DE RIÑÓN DE LA INFECCIÓN OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Resumen

La infección oculta por VHC se caracteriza por la presencia de ARN del VHC en el hígado o en CMSP en ausencia de marcadores serológicos. La infección con el VHC en receptores de TR se asocia con una menor supervivencia del paciente y del injerto. Sin embargo, la relación entre el resultado de TR y VHC oculto positivo es desconocida. Nuestro objetivo fue determinar en una población de receptores de TR la prevalencia, los factores de riesgo y sus implicaciones pronósticas. Evaluamos en 149 adultos receptores de TR, la presencia de VHC oculto. El ARN del VHC se probó mediante RT-PCR en CMSP y en 2 ml de plasma después de la ultracentrifugación. El VHC oculto fue positivo en 21 pacientes (14,1%). La transfusión de sangre previa fue un factor de riesgo para adquirir el VHC oculto ($p = 0,044$). Aunque no hubo diferencias estadísticas en las complicaciones clínicas post-TR y en la IS utilizada en ambos grupos, la supervivencia del injerto y del paciente fue peor en el grupo VHC oculto positivo ($p = 0,02$ y $p = 0,04$), respectivamente. En resumen, hubo una alta prevalencia de VHC oculto en nuestra población con la transfusión de hemoderivados previa como el principal factor de riesgo. La supervivencia a largo plazo del injerto y el paciente estaba disminuida en comparación con los receptores VHC oculto negativos, aunque la contribución de comorbilidades particulares no alcanzó significación estadística.

1.Introducción

La infección crónica por el VHC se ha reconocido como un importante problema de salud en los receptores de RT, con una prevalencia significativamente más alta que en la población general (1-2). La tasa de supervivencia de los receptores de TR infectados por el VHC es mejor que la de los pacientes con hemodiálisis infectados por el VHC en listas de espera para trasplantes (3). Sin embargo, en los receptores de TR, la infección por VHC (a menudo adquirida debido al tratamiento de diálisis) se asocia con enfermedad hepática y es un factor de riesgo independiente de pérdida de injerto, rechazo crónico, glomerulopatía por trasplante, DM post-TR y glomerulonefritis asociada a VHC. El mayor riesgo de muerte en receptores de aloinjerto renal infectados con VHC se ha atribuido a la mortalidad cardiovascular, vinculada de alguna manera a la resistencia a la insulina y al alto riesgo de DM post – TR en lugar de la enfermedad hepática progresiva relacionada con el VHC (4).

La determinación del mejor régimen de inmunosupresión después de TR en presencia de infección por VHC sigue siendo un reto ya que tiene consecuencias significativas sobre la replicación y la enfermedad del VHC (5).

La infección oculta por VHC se caracteriza por la presencia de ARN del VHC en hígado o en CMSP en ausencia de marcadores serológicos. (6) EL VHC oculto también se puede diagnosticar concentrando 2 ml de suero mediante ultracentrifugación seguida de detección de ARN-VHC mediante PCR en tiempo real (7). Nuestro grupo ha encontrado una alta prevalencia de VHC oculto en pacientes en hemodiálisis (8) y también en pacientes con nefropatías glomerulares primarias y secundarias. (9) En ambos grupos, la presencia de VHC oculto se asoció con una peor evolución, incluido un posible papel en la progresión de la enfermedad renal. Sin embargo, Baid-Agrawal et al. encontraron una baja prevalencia de VHC oculto positivo en hemodiálisis crónica y receptores de TR. (10)

Nuestro objetivo fue comprender las implicaciones epidemiológicas y clínicas del VHC oculto positivo en una población de receptores de TR. Revisamos la función del injerto renal según la presencia de VHC oculto, su asociación con neoplasias, infecciones oportunistas, DM post-TR, RA, tratando de descubrir las mejores estrategias de IS y revisando la supervivencia del injerto y los pacientes.

2. Material y métodos

2.1. Pacientes

Este estudio prospectivo incluyó 149 pacientes que asistían a una consulta de Nefrología debido a TR funcionante, en diferentes etapas. Todos los pacientes tenían anti-VHC, así como el antígeno de superficie de la hepatitis B y anti-VIH negativo por una prueba comercial de rutina. No utilizamos donantes VHC positivos, debido a que en nuestro centro su utilización esta reservada para los receptores VHC positivos, previo consentimiento.

Todos los pacientes fueron seguidos por lo menos durante un período de un año, y su pronóstico vital no se vio afectado por ningún proceso conocido. Durante 2015 y 2016, se reclutaron 149 adultos, pacientes no seleccionados. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y se realizó con la Declaración de Helsinki. Cada paciente dio su consentimiento informado por escrito y luego fue evaluado para determinar la presencia de VHC oculto. El tiempo medio de seguimiento fue de $119,8 \pm 77$ meses, en los que se evaluaron la función renal y la incidencia de las complicaciones relacionadas con el TR. Los últimos dos años de este seguimiento permitieron la observación de todos

los pacientes después de las pruebas presencia de VHC oculto para explorar su papel en la supervivencia del injerto y el paciente.

Los parámetros demográficos, epidemiológicos, clínicos y de laboratorio al final del primer año del seguimiento post-TR se muestran en la tabla 1.

El tipo y tiempo en diálisis, las transfusiones de sangre previas, los procedimientos quirúrgicos, contactos en el hogar y parejas diagnosticadas de infección por VHC, la presencia de tatuajes o piercings, se investigaron como posibles factores de riesgo para la infección por el VHC.

Tabla 1: Parámetros demográficos, clínicos y analíticos de los pacientes en el momento del estudio	VHC oculto negativo (N=128)	VHC oculto positivo (N=21)	Significación	Odds ratio	95% Intervalo de confianza
Edad (años; media ± DS)	52,73 ± 14,43	55,19 ± 14,03	0,386		
Varón (n; %)	83; 64,8	12; 57,1	0,625	0,723	0,283-1,845
Tiempo en programa de diálisis (meses; media ± DS)	31,10 ± 21,13	25,55 ± 18,97	0,585		
Tiempo de seguimiento post-trasplante renal (meses; media ± DS)	120 ± 78,56	118,52 ± 68,6	0,475		
Creatinina sérica (mg/dl; media ± DS)	1,58 ± 0,49	1,44 ± 0,86	0,096		
Proteinuria (gr/24h; media ± DS)	0,42 ± 0,65	0,30 ± 0,30	0,247		
<i>Factores de riesgo para la adquisición del VHC: (n;%)</i>					
Tipo de diálisis			0,52	N/D	N/D
Hemodiálisis	52; 43,7	10; 55,6			
Diálisis peritoneal	44; 37	6; 33			
Ninguna	3; 2,5	0; 0			
Ambas	20; 16,8	2; 11,1			
Trasfusión sanguínea previa	91; 71,7	18; 94,7	0,044	7	0,916-5,5332
Contacto con VHC positivo	0; 0	0; 0	0	N/D	N/D
Tatuajes/consumo de drogas	11; 12,8	4; 25	0,247	2	0,622-8,310
Infección VHB	19; 15,7	5; 27,8	0,199	2	0,659-6,467
<i>Etiología de la enfermedad renal (n;%)</i>					
Nefropatía glomerular	37; 29,8	1; 4,8			
Nefropatía hereditaria	35; 28,2	4; 19			
Nefropatía por enfermedad sistémica	14; 11,3	5; 23,8			
Nefropatía túbulo-intersticial	22; 17,7	5; 23,8			
Nefropatía diabética	16; 12,9	6; 28,6			

2.2 Métodos

Detección del ARN del VHC en PBMC y en muestras de plasma

Se aislaron CMSP y plasma a partir de sangre anticoagulada mediante centrifugación en gradiente de densidad de Biocoll (Biochrom, Berlín, Alemania). El plasma se alicuotó y se almacenó a -30°C. Las CMSP se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato y se almacenaron en solución RNAlater (Ambion, Austin, TX) a -30°C.

El ARN total de CMSP se aisló con SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). Después de la precipitación, los gránulos se disolvieron en agua tratada con dietil-pirocarbonato y se determinó la concentración de ARN mediante espectrofotometría.

Además, se ultracentrifugaron 2 ml de plasma sobre un colchón de sacarosa al 10% a 100.000 xg durante 17 h a 4°C. El sedimento se disolvió en 250 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mmol /l, EDTA 10 mmol /l, pH 7,5) y; el ARN total se aisló con Trizol LS Reactivo (Invitrogen, Carlsbad, CA), se precipitó y el sedimento se disolvió en agua tratada con dietil-pirocarbonato.

La amplificación de la región 5' no codificante (NC) del ARN del VHC se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT) con sondas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Dos microlitros de ARN total aislado de 2 ml de plasma ultracentrifugado, o 0,5 µg de ARN total de CMSP se retrotranscribieron y amplificaron en una reacción de un solo tubo que contenía una mezcla de reacción de ARN (LightCycler Master Hybprobe, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las condiciones de esta RT-PCR ha sido descrita previamente. Para la cuantificación se usó una curva estándar construida con diluciones de 10 veces de un ARN de VHC sintético. El límite inferior de detección del ensayo de ARN del VHC fue de 10 UI / ml (ciclo umbral medio [Ct], 39,32) con un límite inferior de cuantificación de 100 UI / ml (Ct media, 35,64), según lo determinado mediante pruebas de diluciones en serie de la muestra de suero positiva al ARN del VHC, en la que se cuantifica el ARN del VHC se evaluó previamente mediante una prueba de VHC (Cobas TaqMan, Roche Diagnostics).

La detección del ARN del VHC fue realizada por personal de laboratorio que desconocía el estado clínico de los pacientes. Cada serie de PCR incluyó un número máximo de 10 muestras junto con controles negativos (repetidamente sueros negativos a ARN del VHC y muestras de CMSP) y reactivos en blanco en los que el ARN total se reemplazó con agua de grado PCR. Los controles y espacios en blanco negativos se procesaron con las muestras y las acompañaron durante todo el proceso de PCR. Como controles positivos, se usaron sueros positivos al ARN del VHC y CMSP de pacientes con infección crónica por el VHC. Las pautas de Kwok e Higuchi (11) se observaron estrictamente para evitar contaminaciones. Para confirmar aún más los resultados de VHC oculto, las muestras positivas y las negativas seleccionadas al azar se volvieron a probar en días diferentes por otra persona que estaba cegada a los resultados previos.

2.3 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados por una base de datos en el programa SPSS versión 20, para su tratamiento estadístico. Para la descripción de variables cuantitativas continuas, la media se utilizó junto con la desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron por frecuencias absolutas y relativas expresadas como un porcentaje. Las

comparaciones entre variables cuantitativas continuas entre los dos grupos independientes se realizaron principalmente utilizando una técnica no paramétrica (Mann-Whitney U Test). Para el análisis de frecuencias entre variables cualitativas, se utilizó la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando fue posible. El análisis de la evolución temporal entre los momentos de las variables cuantitativas se realizó en forma pareada, mediante el T-Test de muestras pareadas. Se utilizó un método de Kaplan-Meier y una prueba de rango logarítmico para calcular la supervivencia del injerto renal y del paciente. Un valor P <0.05 indicó significación estadística.

3. Resultados

De los 149 receptores de TR estudiados, 20 dieron positivo para la presencia de ARN del VHC en CMSP con una concentración media de 1727,35 copias por µg de ARN total (rango 347 - 6810). Se detectó ARN del VHC en el plasma después de la ultracentrifugación de 2 ml de plasma en otro paciente a una concentración de 872 copias por ml de plasma. Por lo tanto, encontramos una prevalencia de infección por VHC oculto de 21/149 (14,1%); estos pacientes tenían ARN viral detectable en CMSP o en plasma después de la ultracentrifugación a pesar de la ausencia de anticuerpos anti-VHC. Registramos la inmunosupresión en el tratamiento de inducción (ATG, Basiliximab) y luego una vez estabilizado en el momento del estudio. La Tabla 2 muestra inmunosupresión de acuerdo con la presencia de VHC oculto. No se encontraron diferencias significativas.

	VHC oculto negativo (n=129)	VHC oculto positivo (n=21)	Significación	Odds ratio	95% Intervalo de confianza
Micofenolato mofetil (n; %)	99; 79,2	18; 85,7	0,767	1.576	0,431-5,761
mTOR (n; %)	22; 17,6	2; 9,5	0,529	0.493	0,107-2,271
ATG (n; %)	42; 49,4	7; 46,7	1	0.896	0,298-2,691
Basiliximab (n; %)	28; 32,9	6; 40	0,572	1.357	0,439-4,192
Inhibidor de calcineurina (n; %)			0,639	N/D	N/D
Tacrolimus	94; 75,2	17; 81			
Ciclosporina	17; 13,6	2; 9,5			
Ninguno	14; 11,2	2; 9,5			
Esteroides (n; %)	89; 71,8	14; 66,7	0,613	0,787	0,293-2,112

ATG: Inmunoglobulina anti-timocítica; mTOR: mammalian Target of Rapamycin.

Las complicaciones clínicas post-TR se muestran en la tabla 3. El RA y crónico tuvo que confirmarse mediante una biopsia de injerto renal. El RFI se definió como la necesidad de diálisis. La presencia de DM post- TR se definió como el requerimiento de antidiabéticos orales o insulina por un período mínimo de 30 días post-TR. Se registraron las infecciones oportunistas en los receptores de TR, así como las infecciones debidas a organismos con resistencia microbiológica.

Tabla 3: Complicaciones clínicas post-trasplante renal de acuerdo a VHC oculto negativo/positivo					
	VHC oculto negativo	VHC oculto positivo	Significación	Odds ratio	95% Intervalo de confianza
	(n=128)	(n=21)			
RFI (n; %)	17; 13,5	2; 9,5	1	0,675	0,144-3,161
Rechazo agudo (n; %)	13; 10,3	2; 9,5	0,603	N/D	N/D
Infección oportunista (n; %)	46; 36,5	7; 33,3	1	0,87	0,327-2,310
Diabetes post-trasplante (n; %)	29; 22,65	6; 28,57	0,384	2	0,834-5,433
Cáncer (n; %)	24; 18,9	7; 33,3	0,151	2	0,781-5,893
Rechazo crónico (n; %)	5; 3,9	2; 9,5	0,257	3	0,469-14,310
Infarto miocárdico (n; %)	14; 11	4; 19	0,289	2	0,559-6,449
ACVA (n; %)	4; 3,1	1; 4,8	0,54	2	0,163-14,467
Pérdida del injerto (n; %)	3; 2,4	2; 9,5	0,147	4	0,682-27,760
Exitus (n; %)	4; 3,1	3; 14,3	0,06	5	1,059-24,796

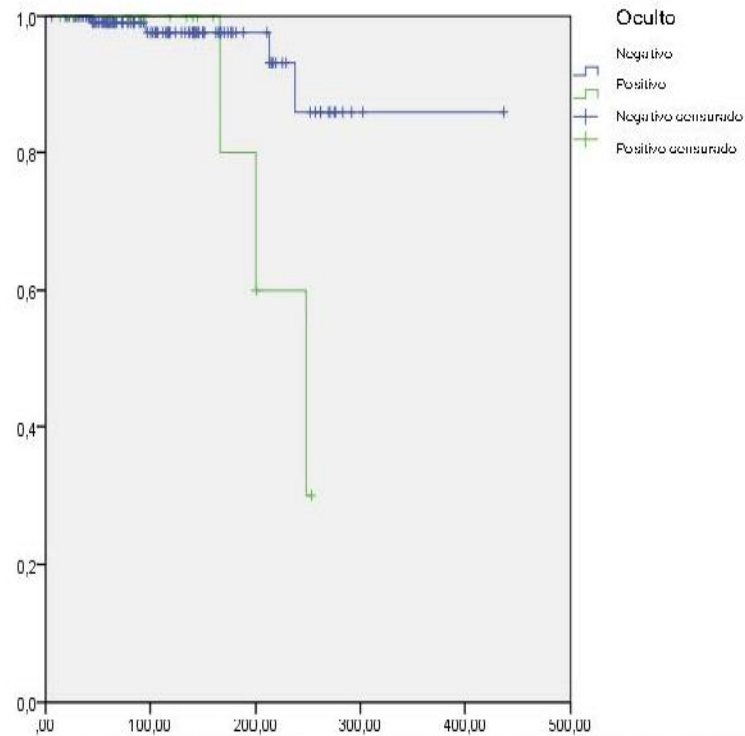
RFI: Retraso en la función del injerto. ACVA: Accidente cerebro-vascular agudo.

En el primer año post TR, la función renal y la proteinuria fueron similares en ambos grupos, aunque la creatinina plasmática y la proteinuria en el grupo VHC oculto positivo fueron ligeramente menores ($1,44 \pm 0,86$, $0,30 \pm 0,30$ (mg/dL)) que en el grupo VHC oculto negativo ($1,58 \pm 0,49$; $0,42 \pm 0,65$ g/día) (NS). Al final del seguimiento con una media de 10 años, la función renal tendió a disminuir más rápidamente y a detectarse más proteinuria en el grupo VHC oculto positivo ($1,93 \pm 1,05$; $0,86 \pm 1,14$ (mg/dL)), que en el grupo VHC oculto negativo, ($1,74 \pm 0,80$; $0,62 \pm 1,38$ (g/día)) aunque no fue estadísticamente significativo.

El tiempo hasta la pérdida del injerto se calculó desde la fecha del TR hasta la fecha de la pérdida del mismo. La supervivencia del paciente se calculó desde el TR hasta la fecha de la muerte. El grupo VHC oculto positivo se asoció con una supervivencia inferior del injerto y el paciente en comparación con el grupo VHC oculto negativos, y esto fue estadísticamente significativo $p < 0,02$ y $p < 0,04$ como se muestra en la figura 1 (A y B). Hubo un receptor en el grupo VHC oculto negativo con supervivencia del injerto a muy largo plazo (432 meses). El análisis estadístico se realizó de nuevo, excluyendo a este paciente y la significación estadística se confirmó $p < 0,02$ y $p < 0,04$.

La pérdida de injerto durante el seguimiento estuvo presente en 5/149 (3,3%) receptores. La glomerulopatía del trasplante fue la principal causa de regreso al programa de diálisis (3/5, 60%), y uno de estos pacientes fue VHC oculto positivo. Los otros dos pacientes, un paciente VHC oculto positivo tenía mieloma múltiple y el último (VHC oculto negativo), tenía un cáncer pélvico.

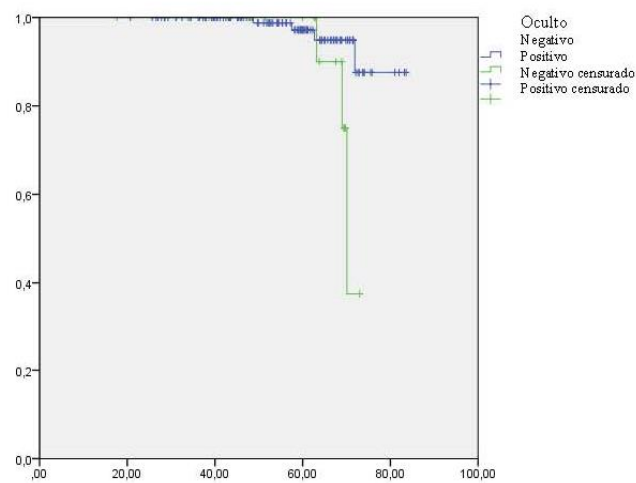
Figura 1A: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia del injerto renal dependiendo de la presencia de infección por el VHC oculto. (Meses).



El tiempo de pérdida del injerto fue calculado desde el trasplante renal hasta la fecha de pérdida.

Los pacientes virus C oculto positivo tenían un aumento significativo de mayor pérdida del injerto que los pacientes virus C oculto negativo (2; 9,5% vs OCI (3; 2,4%), $p=0.02$).

Figura 1B: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia del paciente dependiendo de la presencia de la infección por el VHC oculto. (Años).



La supervivencia del paciente se calculó desde el momento del trasplante renal hasta la fecha de muerte.

Los pacientes virus C oculto positivo tenían una menor supervivencia de forma significativa que los pacientes virus C oculto negativo (3; 14,3% muertes) vs (4; 3,1%), $p=0.04$.

Registramos 7/149 (4.7%) exitus durante el seguimiento, 3/7 VHC oculto positivo y otros 4, VHC oculto negativo. En ambos grupos, el cáncer fue la primera causa de muerte. En el grupo VHC oculto positivo, los exitus se debieron a cáncer de vías urinarias y mieloma, y a muerte súbita. En el grupo VHC oculto negativo a neoplasia del tracto urinario, cuello uterino y cáncer de pulmón y septicemia.

4. Discusión

La prevalencia de VHC oculto positivo en pacientes con TR en nuestro estudio fue del 14,1%, como lo demuestra la detección de ARN-VHC en CMSP o en plasma después de una ultracentrifugación inferior a la encontrada en pacientes en hemodiálisis (45%) y GNIM (38%) y más que en pacientes con ND (8%) (8,9,12). La prevalencia de infección por VHC en TR es bastante variable dependiendo de las áreas geográficas. Un estudio informó una disminución progresiva y marcada en la prevalencia de la infección por el VHC entre los receptores de trasplante renal en España del 29,5% en 1990 al 10% en 1998 (13).

Baid y Agrawal (10) encontraron una baja prevalencia de OCI 2/398 (0,5%) en pacientes con TR. Realizaron un seguimiento longitudinal medio de 30 meses de los 3 pacientes con infección oculta por el VHC, y no hubo evidencia clínica o virológica de infección por VHC. La diferencia encontrada en la prevalencia de VHC oculto en ambos estudios puede ser explicada por la diferencia de prevalencia del VHC en la población general en España (2%) y en Alemania (0,3%).

En el estudio epidemiológico español retrospectivo (GEHEP) del VHC, que abarcó el período 2000-2015, la vía de transmisión más frecuente entre 10,441 pacientes para quienes se dispuso de datos fue la parenteral (58,7%), seguida de origen desconocido (38,6%) y de transmisión sexual (14). Según este estudio, encontramos que la transfusión de sangre previa era el principal factor de riesgo para la adquisición del VHC oculto positivo. Se ha sugerido una infección oculta de VHC en curso entre el 50% de los donantes de sangre que resultaron positivos al anticuerpo específico del núcleo del VHC y fueron negativos para el anti VHC y el ARN del VHC en el cribado de rutina en un estudio de cuarenta y dos donaciones (2,1%) (15). En otro estudio reciente realizado en China que incluía muestras sanguíneas de donantes de sangre que eran anti VHC negativos y en los que se determinó en CMSP, se encontró una prevalencia del 2,2% (16)

El efecto de la infección por VHC sobre el riesgo de RA es controvertido (7). Se ha informado que la tasa de RA en pacientes con infección por VHC es del 14,5% en un período de 20 años (17). Los medicamentos inmunosupresores tienen diversos efectos

sobre la viremia. (18-20). Nosotros no identificamos diferencias estadísticas entre ambos grupos en estrategias de inmunosupresión en la supervivencia del injerto o del paciente, y la neoplasia en el grupo VHC oculto positivo se relacionó con la ERC, y no con medicación inmunosupresora (21).

Los receptores de trasplantes de órganos con una infección por VHC activa existente tienen una mayor frecuencia de infecciones potencialmente mortales después de la cirugía en comparación con los receptores sin infección por VHC (13, 21). No encontramos diferencias en los dos grupos según el resultado del VHC oculto.

En TR, la DM post-TR es una causa importante de morbilidad y mortalidad postrasplante (22). La incidencia es bastante variable según su definición, que varía entre el 2% y el 53%. La prevalencia de DM post- TR ha aumentado (23, 24). Se ha sugerido que, en la práctica clínica, se debe evitar o minimizar el uso de tacrolimus en estos pacientes, y se deben practicar estrategias de inmunosupresión con ahorradores de esteroides. No encontramos diferencias en la inmunosupresión administrada entre ambos grupos pero el positivo VHC oculto positivo tendía a tener más DM post - TR.

Los receptores de TR con VHC tienen una posibilidad reducida de supervivencia en comparación con los receptores de trasplante sin infección por VHC. La tasa de mortalidad en los receptores VHC positivos fue aproximadamente 3 veces mayor que la de los no infectados (12,1% versus 3,7%) (3). El mayor riesgo de muerte en los receptores de aloinjerto renal infectados por el VHC se ha atribuido a la mortalidad cardiovascular. Tampoco encontramos diferencias en los eventos cardiovasculares (IAM o ACVA) y la neoplasia fue la primera causa de muerte en nuestro estudio. En el grupo VHC oculto positivo las muertes se debieron a cáncer de vías urinarias y mieloma, relacionados con ERC, y en neoplasias del tracto urinario de grupo VHC oculto negativo, cáncer de cuello uterino, relacionado con ERC y cáncer de pulmón relacionado con inmunodeficiencia, según Stewart et al (21) y septicemia. No tuvimos ningún hepatocarcinoma. El trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante y el mieloma múltiple se han asociado con la infección por el VHC (25,26), y también hemos encontrado una alta prevalencia de gammapatía monoclonal en la ND en pacientes VHC oculto positivo (28). En un metanálisis reciente realizado por Yuying Li, el VHC aumentó el riesgo de mieloma múltiple en países con alta prevalencia de VHC (27).

5. Conclusiones

En conclusión, en los pacientes con TR existe una menor prevalencia (14.1%) de VHC oculto positivo en comparación con la prevalencia en pacientes con GNIM (39%) o hemodiálisis (45%); La transfusión sanguínea previa fue el principal factor de riesgo para

adquirir la infección por VHC oculto. La supervivencia a largo plazo del injerto y el paciente estaba disminuida en comparación con los receptores VHC oculto negativos, aunque la contribución de comorbilidades particulares no alcanzó significación estadística. En el grupo con VHC oculto positivo, sin embargo, la progresión de la enfermedad renal tendió a ser más rápida. No identificamos diferencias estadísticas entre ambos grupos en las estrategias de inmunosupresión para recomendar claramente ningún régimen de inmunosupresión específico.

Bibliografía

- 1 Pereira B.J. and Levey A. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int* 1997; 52, 981-999.
- 2 Ozer Etik D, Ocal S, Boyacioglu AS. Hepatitis C infection in hemodialysis patients: A review. *World J Hepatol.* 2015 Apr 28;7(6):885-95.
- 3 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, evaluation and treatment of hepatitis C in Chronic kidney Disease. *Kidney Int* 2008; 73 suppl 109, S1-S99. (2017 in press)
- 4 Morales JM. Impact of Extrahepatic Complications (diabetes and Glomerulonephritis) Associated with Hepatitis C Virus Infection after Renal Transplantation. *Hepatitis C in Renal Disease, Hemodialysis and Transplantation. Contrib Nephrol Basel Karger* 2012, vol 176; pp 108-116.
- 5 Morales JM. Hepatitis C in Renal Disease, Hemodialysis and Transplantation. *Contrib Nephrol Basel Karger* 2012, vol 176; pp 97-107.
- 6 Carreño V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications *J Clin Virol* 2014; 61:315-320.
- 7 Bartolome J, López-Alcorocho, Castillo I, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis c virus RNA in patients with hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81:7710-5.
- 8 Barril G, Castillo I, Carreño V. Evidence of occult hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:2288-2292
- 9 Castillo I, Martínez-Ara JA, Olea T, et. al High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 2014; 86: 619-24.

- 10 Baid-Agrawal S, Schindler R, Reinke P, et al. Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients. *J Hepatol* 2014; 60: 928–933.
- 11 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238
- 12 Olea T, Castillo I, González E, et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Diabetic Nephropathy: Epidemiological and Clinical Implications. *WJRR* 2016; Vol 3, Issue 6, pages 65-69.
- 13 Morales JM and Fabrizi F. Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11, 172-182.
- 14 Aguilera A, D Navarro, F Rodriguez-Frias, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes of hepatitis C virus genotypes in Spain during 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *J Viral Hepat.* 2017.
- 15 Quiroga JA, Avellón A, Bartolomé J, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion* 2016; 56: 1883-1890.
- 16 Lin H Chen X, Zhu S et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection among blood donors in Jiangsu, China. *Intervirology* 2016; 59:204-210.
- 17 Roth D, Gaynor JJ, Reddy KR, et al. Effect of kidney transplantation on outcomes among patients with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22, 1152-1160.
- 18 Wathashi K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003;38, 1282-1288.
- 19 Berenguer M, Rayuela A, Zamora J. Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl* 2007; 13:21-29.
- 20 Oriol M, Baid Agrawal S, Moradpour D et al. Immunosuppression in Hepatitis C Virus Infected Patients after Kidney Transplantation. *Contrib Nephrol Basel Karger* 2012, vol 176, pp97-107.
- 21 Stewart JH, Vajdic CM, van Leeuwen MT et al. The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. *Nephrol Dial Transpl* 2009; 24: 3225-3231.
- 22 Scott DR, Wong JK, Spicer TS et al. Adverse impact of hepatitis c virus infection on renal replacement therapy and renal transplant patients in Australia and New Zeland. *Transplantation* 2010; 90, 1165-1171.

- 23 Sneha Palepu, GV Ramesh Prasad. New onset diabetes mellitus after kidney transplantation: Current status and future directions. *World J Diabetes* 2015 April 15; 6(3): 445-455 ISSN 1948-9358.
- 24 G, Muscogiuri G, De Rosa P. New-onset diabetes after kidney transplantation: prevalence, risk factors, and management. *Transplantation* 2012; 93: 1189-1195 [PMID: 22475764]
- 25 Caillard S, Porcher R, Provot F et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant* 2006; 6, 2735-2742.
- 26 Caillard S, Lamy FX, Quelen C et al. Myeloma, Hodgkin disease and lymphoid leukaemia after renal transplantation: Characteristics, risk factors and prognosis. *Transplantation* 2006; 27,888-895.
- 27 Li Y, Li Y, Zhang L et al. Hepatitis C virus infection and risk of multiple myeloma: Evidence from a meta-analysis based on 17 case-control studies. *J Viral Hepatol* 2017 Dec; 24 (12):1151-1158.

CAPITULO 6: RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL TRATADOS CON ANTIVIRALES.

LOS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA SON EFECTIVOS EN LA ERRADICACIÓN TOTAL DEL VHC EN TRASPLANTADOS RENALES.

1. Introducción

El objetivo principal de nuestro estudio fue analizar la efectividad del tratamiento antiviral (convencional o con antivirales de acción directa (AAD)) para la erradicación total del virus de la hepatitis C (VHC) en receptores de trasplante de riñón (TR). Los AAD son medicamentos conocidos aprobados por la FDA para investigaciones clínicas y preclínicas. La eficacia se analizó analizando la presencia de ácido ribonucleico (ARN) del VHC en los gránulos obtenidos después de la ultracentrifugación de muestras de plasma de seguimiento y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con infección por VHC que habían logrado una respuesta virológica sostenida (RVS). También se evaluó la seguridad y las repercusiones renales y hepáticas del tratamiento antiviral.

2. Pacientes y métodos

Evaluamos 18 adultos receptores de TR, cuya infección por VHC se había tratado con terapia antiviral. El ARN del VHC se probó mediante RT-PCR en tiempo real en CMSP y en 2 ml de plasma después de la ultracentrifugación.

3. Resultados

El genotipo del VHC predominante fue 1b (78,6%), seguido por 3a (14,3%) y 2a-2c en 1 paciente (7,1%). De los 18 pacientes, 13 recibieron tratamiento con AAD post-TR y uno pre-TR (8 como primer tratamiento y 5 como retratamiento por haberse reactivado). Los otros 4 pacientes fueron respondedores a INF o INF-RBV y 1 a AAD (pre-TR).

En ninguno de los 14 receptores de TR tratados con AAD se detectó la presencia de VHC ARN ni en CMSP ni en plasma tras ultracentrifugación. Tampoco se detectó el ARN viral en las CMSP de los 5 pacientes con RVS tras tratamiento con IFN (en monoterapia o con RBV). Sin embargo, uno de ellos fue positivo al ARN VCH en plasma mediante ultracentrifugación. Este paciente, varón y diagnosticado de VCH genotipo 1b, había recibido INF- PEG en monoterapia previo al TR.

Durante un tiempo de seguimiento medio de $26,61 \pm 6,03$ meses post tratamiento antiviral de los pacientes tratados con AAD, objetivamos un aumento significativo de proteína/creatinina ($P=0,001$), de forma significativa, aunque no tuvo repercusión sobre

la función renal del injerto. La función hepática mejoró de forma significativa medida como disminución de AST y ALT ($P=0,006$ y $P= 0,011$), respectivamente. La peor evolución del injerto renal de la serie, fue en el paciente que presentó el ARN del VHC por ultracentrigación, debido a infección por virus del poliooma después de un rechazo humoral. La función hepática a pesar de tener RVS, únicamente persistió alterada en este paciente.

4. Conclusiones

Aunque se trata una pequeña serie de pacientes y se requieren más estudios, el tratamiento con AAD es eficaz para la erradicación completa del virus a diferencia de los tratamientos convencionales con INF, en los que el VHC puede persistir siendo indetectable con técnicas convencionales. Esta persistencia parece repercutir en la evolución post-TR.

Introducción

Entre un 1,8 y un 8 % de los pacientes receptores de trasplante renal están infectados por el virus de la hepatitis C (VHC)(1). A pesar del mayor riesgo complicaciones respecto a pacientes trasplantados renales sin el VHC clásico, su supervivencia es mayor cuando se compara a la de pacientes en hemodiálisis. (2) Las terapias antivirales convencionales no eliminaban el VHC de forma eficiente y segura. El interferón- α , la ribavirina y las terapias basadas en inhibidores de la proteasa eran las mejores opciones. (3) Sin embargo, el interferón α está asociado a escasa respuesta viral sostenida (RVS) (carga viral negativa después de 12 semanas de finalización del tratamiento antiviral) (13-43%) y esta contraindicado en el post-trasplante renal debido a la alta prevalencia de efectos adversos (rechazo del injerto renal). (4) La monoterapia con ribavirina no era eficaz y respecto a los inhibidores de la proteasa, su empleo estaba limitado en el post-trasplante renal debido a las interacciones con los inhibidores de la calcineurina y severos efectos adversos. (5)

Los nuevos antivirales de acción directa (AAD) han sido considerados recientemente seguros para el tratamiento del VHC en el post-TR. (6-9) Los receptores de trasplante renal que recibieron por lo menos dos clases distintas de AAD consiguieron RVS a las 12 semanas un 90% (10). En una reciente revisión se evaluó la eficacia y seguridad del tratamiento con AAD en receptores de TR con infección crónica por el VHC. El 98,3 % de los pacientes presento una RVS, y la función hepática mejoró significativamente y, sin embargo, no se registró empeoramiento de la función renal (11).

Se ha comprobado en pacientes con hepatitis C y sin enfermedad renal, que el VHC-ARN puede permanecer en hígado y en CMSP después de obtenerse una RVS tanto por tratamientos convencionales como por tratamiento con AAD (12-15). También se ha demostrado que la presencia de VHC- RNA después de ultracentrifugación de muestras de suero, en pacientes con RVS puede predecir la reactivación del VHC (14).

Siendo inmunológicamente comprometidos los trasplantados renales, quisimos valorar la eficacia de los tratamientos antivirales convencionales y AAD en aquellos con RVS, evaluando el VHC-ARN mediante ultracentrifugación o en CMSP. La combinación de estos ensayos permite la identificación de más del 80% de los pacientes con una infección oculta de VHC oculta en el hígado [15]), así como revisar la seguridad de las repercusiones hepáticas y renales del tratamiento antiviral.

Pacientes y métodos

Se analizaron 18 pacientes receptores de trasplante renal, mayores de 18 años, cuya infección por VHC había sido tratada con antivirales y presentaban RVS, que acudían a nuestro servicio de Nefrología para seguimiento. Se obtuvo un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité de ética para la investigación clínica. Se excluyeron aquellos pacientes que no hubieran alcanzado la RVS o tuvieran una reactivación de la viremia en el momento del estudio. El momento y el tipo de tratamiento se encuentra recogido en la figura 1.

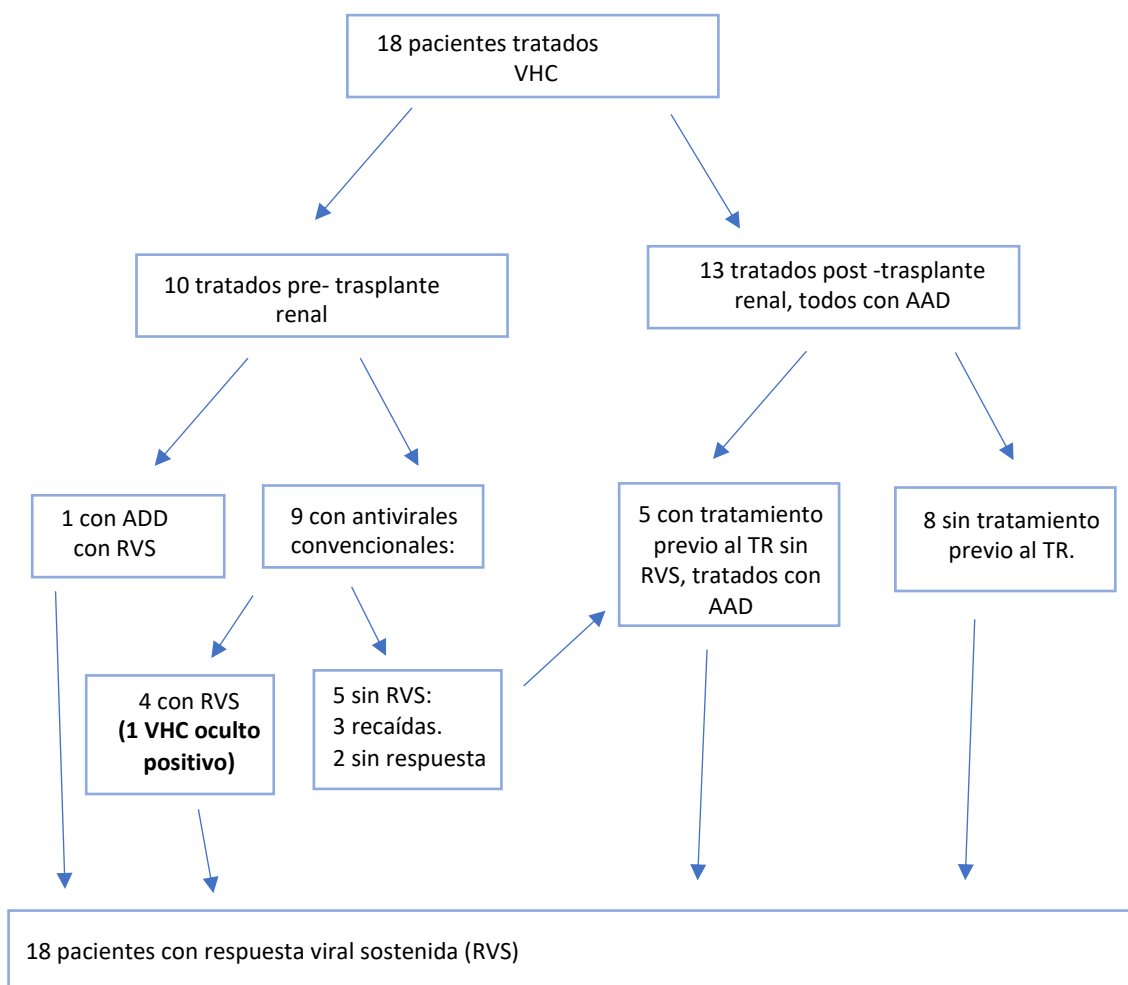


Figura 1: Tratamiento de la infección por el VHC de los 18 receptores de trasplante renal.

Se recogieron distintas variables en relación a la causa de la insuficiencia renal, el tipo de diálisis recibida, el número de trasplantes previos, el genotipo del VHC y los tratamientos antivirales recibidos, así como el momento de tratamiento antiviral (diálisis o con TR funcionando), cuyos datos se encuentran recogidos en la tabla 1.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los 18 pacientes.	
Edad (media \pm DS)	55,4 \pm 9,09
Varón (n; %)	13; 72,2
Enfermedad renal crónica (n; %)	
Glomerular	10; 55,6
Hereditaria	4; 22,7
Otras	4; 22,7
Tipo de diálisis (n; %)	
Hemodiálisis	10; 55,6
Diálisis peritoneal	2; 11,1
Ambas	5; 27,7
Ninguno	1; 5,6
Genotipo VHC (n; %)	
1b	11; 78,6
2a-2c	1; 7,1
3	2; 14,3
N/D	4; 22,7
Momento del tratamiento antiviral (n; %)	
Post-trasplante renal	13; 72,23
Tratamiento antiviral (n; %)	18; 100
INF o INF-PEG	3; 16,7
INF-RBV	1; 5,6
AAD	9; 50
Varios	5; 27,7
Tiempo desde el tto. Antiviral hasta determinación (meses) (media \pm DS)	26,63 \pm 6,03
Tiempo de TR (meses) (media \pm DS)	146,66 \pm 110,10

VHC: Virus hepatitis C, N/D: No disponible; INF: Interferón- α , INF-PEG: Interferón pegilado, RBV: Ribavirina; AAD: antivirales de acción directa; TR: Trasplante renal.

En aquellos receptores de TR tratados post-TR se analizó la función hepática y renal pre y post-tratamiento con AAD, así como el número de rechazos del injerto renal, interacciones y complicaciones del tratamiento antiviral.

Métodos

Se aislaron plasma y CMSP de sangre anticoagulada por centrifugación en gradiente de densidad (Biocoll, Biochrom, Berlín, Alemania). Las muestras de plasma se

almacenaron a -30 °C y las CMSP a -30 °C en solución RNAlater (Ambion, Austin, TX) hasta la detección de VHC -ARN.

Dos mililitros de plasma se ultracentrifugaron en un cojín de sacarosa al 10% durante 17 horas a 100.000 xg y 4 ° C para concentrar las partículas de VHC (16). El sedimento se disolvió en 250 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM; pH 7,5) y el ARN se aisló con el reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de la precipitación, el sedimento de ARN se disolvió en 10 µl de agua libre de nucleasas. El ARN total se aisló de CMSP utilizando el Sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI). Después de la precipitación con isopropanol, el sedimento de ARN se disolvió en 10 µl de agua libre de nucleasas y su concentración se midió por espectrofotometría.

La detección de la región no codificante 5 'de VHC -ARN se realizó mediante Transcripción inversa (TI)-PCR en tiempo real con sondas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Dos microlitros de ARN total aislados de 2 ml de ultracentrifugado. El plasma, o 0,5 lg de ARN total de CMSP se retrotranscribió y amplificó en una reacción de un solo tubo que contenía la mezcla de reacción de ARN (LightCycler Master Hybprobe, Roche, Mannheim, Alemania). Cebadores, sondas y condiciones de esta reacción de TI-PCR han sido reportados previamente (17). Para evitar contaminaciones, las pautas de Kwok y Higuchi (18) se observaron estrictamente para evitar los falsos positivos y los controles negativos y los blancos se copiaron con las muestras y se acompañaron durante todo el proceso de PCR. Como controles positivos, se utilizaron plasma de ARN del VHC positivo y CMSP de pacientes con infección crónica por VHC.

Estadística

Las variables categóricas fueron comparadas usando el test chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, según correspondiera. Las variables continuas fueron calculadas las medias usando t de Student para datos pareados, y la significación mediante los tests U de Mann-Whitney y Wilcoxon. Todo ello utilizando el programa SPSS versión 20.0

Resultados

Las características de los pacientes TR, tratados con AAD, y los tratamientos utilizados se recogen en la tabla 2. El régimen más empleado fue sofosbuvir/ledipasvir y el FG inicial en todos los pacientes el FG fue >30 ml/min. No hubo efectos adversos durante el tratamiento antiviral relevantes que requirieran hospitalización o suspensión de la terapia. Todos los pacientes tratados post TR, recibieron la terapia después de los 6

meses post TR, con función renal estable, niveles estables de anticalcineurínicos y dosis bajas de esteroides, (en el caso de estar con estos tratamientos).

Tabla 2: Características de los 14 receptores de TR tratados con AAD.

Número	Edad	Sexo	Genotipo VHC	Tratamiento inmunosupresor	Tratamiento anti-viral
1	59	F	1b	CyA+MMF	Sofosbuvir/ledipasvir
2	51	H	1b	FK+MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir, previo INF
3	55	H	1b	MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
4	65	F	1b	FK+MMF+Pred	Elbasvir/grazoprevir
5	68	H	2a-2c	FK+Sirol	Sofosbuvir/ledipasvir, previo INF
6	61	F	1b	FK+MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
7	61	F	3a	MMF+CyA	Sofosbuvir/daclastavir
8	44	H	1b	CyA+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
9	46	H	1b	CyA+MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
10	42	H	N/D	MMF	Sofosbuvir/ledipasvir, previo INF
11	56	H	1b	MMF+FK	Sofosbuvir/ledipasvir, previo INF sin RVS
12	63	H	N/D	FK+MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
13	52	H	N/D	FK+MMF+Pred	Sofosbuvir/ledipasvir
14	74	H	1b	FK+MMF+Pred	Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir/Dasabuvir, previo INF sin RVS

TR: Trasplante renal; AAD: antivirales de acción directa, VHC: Virus de la hepatitis C, INF: Interferón- α ; N/D: No disponible; CyA: ciclosporina; MMF: micofenolato mofetil; FK: tacrolimus; Pred: Prednisona; Sirol: Sirolimus;

En ninguno de los 14 receptores de TR tratados con AAD se detectó la presencia de VHC ARN ni en CMSP ni en plasma tras ultracentrifugación. Tampoco se detectó el ARN viral en las CMSP de los 4 pacientes con RVS tras tratamiento con IFN (en monoterapia o con RBV). Sin embargo, uno de ellos fue positivo al ARN VCH en plasma mediante ultracentrifugación. Este paciente, varón y diagnosticado de VCH genotipo 1b, había recibido INF- PEG en monoterapia previo al TR, y durante el seguimiento posterior de 103 meses no se detectó la presencia de VHC-ARN en suero mediante técnica convencional. La supervivencia del injerto y del paciente fue del 100% al final del seguimiento.

La función hepática mejoró de forma significativa después del tratamiento con AAD, en los 14 pacientes, medidos mediante la detección de AST, ALT, donde ambos disminuyeron post tratamiento ($P= 0,006$ y $P =0,011$), respectivamente.

De los pacientes incluidos en el estudio, 17 habían recibido previamente diálisis (hemodiálisis en 55,6 %, diálisis peritoneal en 11,1 % y ambas en 27,8 %), y el paciente restante se trasplantó de donante vivo pre- diálisis. 10 pacientes (55,6%), tuvieron su primer TR, 7 el segundo (38,9%) y 1 paciente había recibido su tercer TR (5,6%).

Respecto al tratamiento antiviral, 10 pacientes fueron tratados previamente al TR; 1 con AAD (en el que no se objetivo recaída), 8 con INF- α , y en un caso, con INF- α y RBV (9 pacientes, tratados con antivirales convencionales). De ellos, 4 presentaron RVS, otros 3 se reactivaron tras finalizar el tratamiento y 2 no respondieron, siendo la eficacia del tratamiento pre-TR con antivirales convencionales de un 50%. Los 5 pacientes que no respondieron pre-TR o recayeron pre-TR fueron tratados post TR con AAD y otros 9 más que no habían recibido tratamiento pre-TR. En total 14 pacientes fueron tratados con AAD (13 post TR y uno pre TR). Todos los pacientes completaron el tratamiento con AAD y fueron seguidos un mínimo de 12 meses post tratamiento antiviral con un tiempo de seguimiento medio de $26,61 \pm 6,03$ meses.

No se objetivaron diferencias significativas en la función renal del injerto pre y post tratamiento con AAD (en los 13 pacientes tratados post TR). El índice proteína/creatinina aumentó de forma significativa, después del tratamiento, pero no se asoció al tratamiento con ledipasvir/sofosbuvir, al genotipo, o al tipo de enfermedad renal de base, de forma significativa. Los resultados sobre la función hepática y renal se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3: Parámetros hepáticos y renales pre y post tratamiento antiviral.			
	pre-tratamiento	post-tratamiento	Significación
AST (U/l) (media \pm DS)	44 \pm 35,9	18,86 \pm 8,7	0,006
ALT (U/l) (media \pm DS)	46,6 \pm 45,36	18,86 \pm 8,70	0,011
GGT (U/l) (media \pm DS)	54,53 \pm 51,91	42,8 \pm 58,26	0,422
Bilirrubina total(mg/dl) (media \pm DS)	0,64 \pm 0,22	0,57 \pm 0,24	0,463
Creatinina (mg/dl) (media \pm DS)	1,39 \pm 0,29	1,42 \pm 0,62	0,278
CKD-EPI (ml/min/1,73 m ²) (media \pm DS)	55,96 \pm 16,97	57,53 \pm 19,24	0,388
proteína/creatinina (mg/g) (media \pm DS)	63,25 \pm 13,48	327,5 \pm 41,50	0,001

AST: Alanino aminotransferasa; ALT: Aspartato aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

Respecto a la evolución del paciente con virus C oculto positivo, presentó una nefropatía por virus del poliooma con posterioridad al diagnóstico y tratamiento de un rechazo humoral. La función renal del injerto de este paciente no había sido considerada para la evaluación renal dado que fue tratado previamente al TR con INF- PEG. Su función renal y la evolución del injerto renal ha sido la peor de la serie, a pesar de que presentaba un tiempo de seguimiento de 103 meses, menor a la media de la serie. Por último, su función hepática no mejoró de forma significativa, a diferencia del resto de pacientes de la serie.

Discusión

El principal hallazgo en este estudio es la seguridad que representa saber que la infección por el VHC oculto es negativa en pacientes tratados con AAD aunque sea trasplantados renales y por tanto, inmunosuprimidos.

Solo en un varón diagnosticado de VHC genotipo 1b, tratado previo al TR con INF-PEG en monoterapia, se detectó ARN del VHC en plasma mediante ultracentrifugación. El ARN del VHC no se detectó en ningún caso mediante RT-PCR en CMSP y tampoco en los 14 receptores de TR tratados con AAD por RT-PCR en CMSP y en plasma después de la ultracentrifugación.

Eficacia

Todos los pacientes tratados con AAD, (1 pre-TR y 13 post-TR) completaron el tratamiento prescrito. El 100% de los pacientes tratados con AAD presentaron una RVS, y en ningún caso se detectó el ARN del VHC mediante RT-PCR en CMSP ni en plasma tras ultracentrifugación, durante un periodo de seguimiento de $26,61 \pm 6,04$ meses.

Seguridad y tolerancia del tratamiento con AAD:

La función hepática mejoró de forma significativa después del tratamiento con AAD, medidos mediante la detección de AST y ALT donde ambos disminuyeron post tratamiento. No se objetivaron diferencias significativas en la función renal del injerto pre y post tratamiento con AAD. Estos hallazgos han sido también encontrados en una reciente revisión, (11). Sin embargo, si se objetivó un empeoramiento del índice proteína /creatinina poco después de la terapia, en 4 pacientes que habían recibido AAD post-TR, (28,5%). La supervivencia del injerto y del paciente fue del 100 %, por lo que nuestros datos son muy similares a los de Lubetzky y col. En esta serie se analizaron 31 pacientes, tratados con nuevos AAD, post-TR de los cuales 6 presentaron un empeoramiento de proteinuria (19,3%) y en los que hubo una tendencia a ser tratados con ledipasvir/sofosbuvir, en comparación con el grupo control ($0,36 \pm 0,72$ g/g, $P=0,06$). De entre los 6 pacientes, en dos casos objetivaron un empeoramiento de función renal (19). En nuestra serie únicamente en un paciente la proteinuria basal fue positiva y al final del seguimiento en 4 pacientes era positiva, a diferencia del trabajo de Lubetzky y cols en el que ningún paciente desarrolló proteinuria de novo. De entre estos pacientes, 1 paciente estaba en tratamiento con sirolimus por un linfoma, y otro había sido diagnosticado de una gammopatía monoclonal de significado incierto en el pasado y presentaba una enfermedad de Von Willebrand severa, por lo que no se pudo realizar biopsia renal, para descartar gammapatía monoclonal de significado renal. Tampoco se

realizó biopsia renal en otro paciente con proteinuria de nueva aparición en un paciente con retraso mental, que se hizo intermitente con antiproteinúricos. Todos los pacientes con índice proteína /creatinina positivo recibían antiproteinúricos y había sido biopsiado un paciente y diagnosticado de un rechazo humoral, después de recibir el tratamiento antiviral con AAD. En nuestra pequeña serie el aumento de proteína /creatinina no se asoció al tratamiento con ledipasvir/sofosbuvir, al genotipo del VHC o al tipo de enfermedad renal de base, de forma significativa. Otros trabajos también han descrito aparición de proteinuria en pacientes tratados con nuevos AAD, que incluyen 5 pacientes con desarrollo de glomerulonefritis focal y segmentaria y otro caso con desarrollo de glomerulonefritis mediada por inmuno-complejos *lupus-like*. (19-22).

Se ha sugerido como hipótesis, el daño directo podocitario, la reconstitución inmune y la interacción con medicación inmunosupresora concomitante (20).

Recomendamos por tanto vigilancia de análisis orina antes, durante y después del tratamiento con antivirales AAD, y en caso de aparecer proteinuria derivar al paciente al nefrólogo. Si bien la proteinuria es un marcador de daño renal, su escasa cuantía podría no representar tanto daño.

Respecto al paciente con infección por el VHC oculto por ultracentrifugación la persistencia de alteración en las transaminasas refuerza la hipótesis de daño hepático silente, ya que esto no ocurrió en el resto de pacientes de la serie. Sin embargo, no sufrió reactivación de su hepatitis C y tampoco parece que esto afectara de forma directa a su evolución post-TR durante el tiempo de observación.

La detección del virus por esta técnica sigue siendo un marcador de la evolución del paciente y cuando existan más datos de investigación podría orientar a la necesidad o no de recibir tratamientos adicionales.

En conclusión, aunque se trata una pequeña serie de pacientes, y se requieren más estudios, el tratamiento con AAD es eficaz con erradicación completa del virus, a diferencia de los tratamientos convencionales, con INF, en los que el VHC puede persistir, siendo indetectable con técnicas convencionales y esta persistencia parece repercutir en la evolución post-TR.

Bibliografía

- 1 Scott DR, Wong JK, Spicer TS et al. Adverse impact of hepatitis c virus infection in renal replacement therapy and renal transplantation in patients in Australia and New Zealand. *Transplantation* 2010; 90:1165-71.
- 2 Ingsathit A, et al: Survival advantage of kidney transplantation over dialysis in patients with hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *Transplantation* 2013; 95: 943-948.
- 3 Fabrizi F, Dixit V, Martin P, et al. Meta -analysis: anti-viral therapy of hepatitis C virus-related liver disease in renal transplant patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1413-22.
- 4 Berenguer M. Systematic review of the treatment of established recurrent hepatitis C with pegylated interferon in combination with ribavirin. *J Hepatol* 2008; 49:274-87.
- 5 Nair SP. Protease inhibitor therapy post-liver transplantation in the treatment of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Hepatol* 2013; 9:388-90.
- 6 Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M et al. Daclastavir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 211-21.
- 7 Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, et al. Simeprevir plus sofosbuvir with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responder to pegylated interferon and ribavirin and treatment naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 2014; 384: 1756-65.
- 8 Afdhal N, Redd y KR, Nelson DR, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 1879-93.
- 9 Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 1483-93.
- 10 Lawitz E, Mangia A, Wyles D, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013; 368: 1878-87.
- 11 Keliang Chen BD, Pei Lu, Reijin Song, et al. Direct- acting antiviral agent efficacy and safety in renal transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *Medicine* 2017; 96: 30.

- 12 Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41:106–114.
- 13 Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, López-Alcorocho JM, Pardo M, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis C virus replicates in the liver of sustained responder patients to antiviral treatment. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1277–1283.
- 14 I Castillo, J Bartolomé, JA Quiroga, et al. Presence of HCV -RNA after ultracentrifugation of serum samples during the follow-up of chronic hepatitis C patients with a sustained virological response may predict reactivation of hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 477-486.
- 15 Castillo I, Bartolome J. Quiroga JA et al Diagnosis of occult hepatitis C virus without the need of or liver biopsy *J Med Virol* 2010; 82-1554-9.
- 16 Elmasry S, Wadhwa S, Bang BR, et al. Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent iinfection after liver transplantation. *Gastroenterology* 2017;152: 550-553.
- 17 Bartolome J, López-Alcorocho, Castillo I, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis c virus RNA in patients with hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81:7710-5.
- 18 Quiroga JA, Avellón A, Bartolomé J, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion* 2016; 56: 1883-1890.
- 19 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238
- 20 Lubetzky M, Chun S, Joelson A, et al. Safety and efficacy of treatment of hepatitis C in kidney transplant recipients with direct acting antiviral agents. *Transplantation* 2017; 101: 1704-10.
- 21 Jonathan J. Hogan, Mary Ann Lim, Matthew B. Palmer, et al. Development of Proteinuria and Focal Segmental Glomerulosclerosis During Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2017;16 (2): 658-660.
- 22 Lin MV, Sise ME, Pavlakis M et al. Efficacy and safety of direct acting antivirals in kidney transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2016;11:e0158431.

23 Sise ME, Wisocky J, Rosales IA, et al. Lupus-like immune complex-mediated glomerulonephritis in patients with hepatitis C virus infection treated with oral, interferon-free, direct-acting antiviral therapy. *Kidney Int Rep* 2016;1:135-143.

CAPITULO 7. DISCUSIÓN GENERAL

Existe una elevada prevalencia de hepatitis virus C oculta en nuestras muestras poblacionales de pacientes con enfermedad renal crónica (enfermedad glomerular (38%), ND (8%) y TR (14,1%), demostrada mediante detección de RNA-VHC en CMSP o en plasma tras ultracentrifugación.

Baid- Agrawal y col. encontraron una baja prevalencia de VHC oculto positivo 2/398 (0,5%) en pacientes con TR y en programa de hemodiálisis. En un seguimiento longitudinal medio de 30 meses de los 3 pacientes con infección oculta por el VHC, no hubo evidencia clínica o virológica de infección por VHC. La diferencia encontrada en la prevalencia de VHC oculto en ambos estudios puede ser explicada por la diferencia de prevalencia del VHC en la población general en España (2%) y en Alemania (0,3%). Los autores sugieren que la alta prevalencia de infección oculta por el VHC documentada en nuestros estudios pueda deberse a la contaminación cruzada durante la detección del ARN del VHC, sin embargo, en estos estudios, se descartó la contaminación cruzada porque la positividad al ARN del VHC en células mononucleares de hígado o sangre periférica se confirmó amplificando una región diferente del genoma del VHC y mediante clonación, secuenciación y análisis filogenético de los productos de PCR.

La incidencia de VHC determinado mediante técnicas convencionales, ha disminuido progresivamente en los países europeos en los últimos años debido a la implementación de políticas activas para evitar la transmisión en unidades de diálisis, lo que podría explicar como en nuestro primer estudio en enfermos con nefropatías glomerulares realizado hace casi 5 años, la prevalencia de virus de la hepatitis C oculto fue mayor, y ésta ha disminuido en las siguientes poblaciones de nefropatía diabética y receptores de trasplante renal realizadas con posterioridad (GEOPTÉ). Quizá la inmunosupresión farmacológica, que forma parte de el tratamiento de algunos pacientes con enfermedad glomerular y de los pacientes receptores de trasplante renal, pueda explicar que la incidencia en estos dos grupos sea mayor, tal y como se ha demostrado con el VHC clásico en los que la prevalencia de VHC esta aumentada en aquellos pacientes con inmunosupresión.

De acuerdo a nuestros estudios, el numero de pacientes que refirieron factores de riesgo para la adquisición del virus de la hepatitis C clásico, estaba aumentado en pacientes virus C oculto positivo, tanto en aquellos con enfermedades glomerulares, como en especial en receptores de trasplante renal, en los que resultado estadísticamente significativo, la relación con transfusiones sanguíneas. Se ha sugerido una infección oculta de HCV en curso entre el 50% de los donantes de sangre que resultaron positivos

al anticuerpo específico del núcleo del VHC y fueron negativos para el anti VHC y el ARN del VHC en el cribado de rutina en un estudio (2,1%) de cuarenta y dos donaciones. Encontramos una alta incidencia de gammapatías monoclonales, en pacientes VHC oculto positivo, diagnosticados de ND y un TR, que finalmente falleció, lo que sugiere una posible asociación entre trastornos hematológicos y presencia de VHC oculto, tal y como se ha sugerido en algunos estudios de VHC clásico. Esta relación ha sido descrita en un reciente metanálisis realizado por Yuying Li, en el que el VHC aumentó el riesgo de mieloma múltiple en países con alta prevalencia de VHC. Otro estudio midió la prevalencia de VHC oculto en pacientes con mieloma múltiple, encontrándose que el 24,5% de los pacientes con MM tenían VHC oculto positivo en comparación con el 3% solo en el grupo control (valor $p = 0,01$), lo que sugirió una asociación de VHC oculto positivo con MM.

En cuanto a las diferencias encontradas atendiendo al tipo de enfermedad renal de base en nuestro primer trabajo, encontramos una elevada prevalencia de GNIM en comparación con GNH, sin embargo, cuando analizamos la etiología en los trasplantados renales, en nuestro tercer trabajo, la prevalencia en enfermedades según la etiología no se confirmó y las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Nuestros trabajos pueden presentar problemas de potencia estadística por la presencia de un tamaño muestral limitado especialmente cuando estratificamos.

Sin embargo, independientemente de la etiología de la enfermedad renal, en nuestros tres estudios prospectivos, aunque no fue estadísticamente significativo, observamos tal y cómo esta descrito en infección por VHC clásico mayor progresión de insuficiencia renal, en enfermos con infección VHC oculto positivo.

Aunque existe cierta controversia, sobre la repercusión y el posible riesgo cardiovascular aumentado en pacientes con VHC clásico, nosotros no pudimos confirmarlo en los trabajos en los que fue analizado (segundo y tercero), quizá porque la enfermedad por el VHC oculto sea una expresión más leve de la enfermedad viral.

También esta descrito, tal y cómo se indico en la introducción una contribución de la infección por el VHC clásico a las complicaciones del TR y a la supervivencia del injerto y del paciente en receptores de TR. Aunque en el trabajo de Baid-Agrawal, no referían repercusión sobre la evolución, durante un seguimiento medio de 30 meses, nosotros aunque no demostramos ninguna contribución en una comorbilidad específica, nuestra interpretación de los resultados, del tercer trabajo, es que la suma de las pequeñas diferencias aunque no significativas, de mayores comorbilidades en el grupo de VHC oculto positivo puede finalmente tras casi 10 años de seguimiento medio explicar la significación en las diferencias de supervivencia del injerto y del paciente.

Por ultimo, quisimos comprobar la prevalencia y si existían diferencias en la presencia de VHC oculto, entre tratamientos antivirales, en una pequeña muestra de pacientes VHC positivos tratados. Calculamos que existe una prevalencia de receptores de TR con anti VHC positivos entre el 2,5-3%, en nuestro área sanitaria, en 2018. Únicamente encontramos un receptor de TR, con presencia de VHC oculto que había sido tratado con INF en monoterapia previo a un segundo TR. Pardo et al. describieron la respuesta al tratamiento antiviral con INF-PEG y RBV, del VHC oculto, en una muestra de 10 pacientes, durante un seguimiento de 6 meses. Los resultados del estudio demostraron que las partículas intactas virales están presentes en estos pacientes indicando replicación viral.

Este estudio fue realizado en una época en la que el tratamiento con INF-PEG y RBV eran la forma habitual de tratamiento, con la aparición de nuevos AAD, quisimos realizar el estudio en pacientes en los que se emplearon estos fármacos para el tratamiento por VHC, para evaluar su eficacia en la erradicación del VHC oculto, lo que podría sugerir beneficio en el tratamiento en esta entidad. Nuestros resultados en conjunto, sugieren un beneficio en el tratamiento del VHC oculto con los nuevos AAD aunque se requieren mas estudios que corroboren nuestros hallazgos.

Conclusiones generales

- Existe una elevada prevalencia de hepatitis virus C oculta en nuestras muestras poblacionales de pacientes con enfermedad renal crónica (enfermedad glomerular, nefropatía diabética y trasplantados renales), demostrada mediante detección de RNA-VHC en CMSP o en plasma tras ultracentrifugación.
- A pesar de que los datos no fueron estadísticamente significativos, la progresión de la insuficiencia renal, tendió a ser mas rápida en aquellos pacientes con VHC oculto positivo, en pacientes con nefropatías glomerulares, diabéticos y trasplantados renales, indicando que el virus oculto por VHC puede ser un factor pronostico negativo universal como ocurre con la infección por VHC clásico. Este hecho refuerza la significación biológica del virus de la hepatitis C oculto.

Conclusiones particulares

- De acuerdo a nuestros estudios, el número de pacientes que refirieron factores de riesgo para la adquisición del VHC clásico, estaba aumentado en pacientes VHC oculto positivo, tanto en aquellos con enfermedades glomerulares, como en especial la trasfusión de hemoderivados en receptores de TR.
- Encontramos una alta incidencia de gammapatías monoclonales, en pacientes VHC oculto positivo, diagnosticados de ND y un TR, lo que les indujo una peor evolución. Este virus como modulador de la respuesta inmune parece ser capaz de inducir fenómenos de clonalidad.
- Nuestros datos indican que la presencia de VHC oculto juega un papel limitado, en el control de la diabetes, el riesgo cardiovascular tanto en pacientes con ND como en receptores de TR.
- Aunque la contribución particular a las complicaciones propias del TR también fue limitado, sin embargo, la supervivencia del injerto y del paciente, a largo plazo, estaba disminuida en aquellos receptores de TR VHC oculto positivo.
- En pacientes trasplantados renales anti-VHC positivo, el empleo de los nuevos AAD parece más eficaz y seguro, que los antivirales convencionales.

Aplicación clínica

La detección del virus de la hepatitis C oculto en nuestras muestras de pacientes con nefropatía glomerular y diabética, así como en trasplantados renales anti-VHC negativo, proporciona una base racional para la administración de terapia antiviral dado que su presencia conlleva una peor evolución de la función renal a medio plazo, y menor supervivencia del paciente y del injerto a largo plazo del TR.

Fortalezas

Se ha comprobado la existencia de la infección oculta por VHC, y su repercusión clínica en distintas subpoblaciones de enfermos renales, en los que su presencia confiere una peor evolución.

Se ha podido confirmar la eficacia (determinando la presencia de VHC oculto), y seguridad del tratamiento con los nuevos AAD en comparación con los antivirales convencionales y su utilidad en la erradicación total del VHC oculto.

Limitaciones

- Limitado tamaño muestral y potencia estadística. Nuestros trabajos pueden presentar problemas de potencia estadística por la presencia de un tamaño muestral limitado especialmente al estratificar.
- Limitación geográfica y racial.
- Determinación en una muestra aislada por paciente del VHC oculto.

Futuras líneas de investigación

- Estudios de eficiencia sobre la detección y tratamiento del VHC oculto con nuevos AAD.

Anexos: Comunicaciones en congresos y publicaciones:

Comunicaciones póster:

- 1 Congreso de la Sociedad Española de Nefrología 2015.** “Infección oculta por el Virus de la Hepatitis C en pacientes con nefropatía diabética: Implicaciones clínicas y epidemiológicas” Teresa Olea, Inmaculada Castillo, Elena González, Lucía Gayo, Javier Bartolomé, Marco Vacas, Juan Antonio Quiroga, Rosario Madero, Rafael Selgas, Vicente Carreño.
- 2 Congreso de la Sociedad Española de Nefrología 2016.** Virus de la hepatitis C oculto en pacientes con trasplante renal: Implicaciones clínicas. Teresa Olea, Inmaculada Castillo, Gabriel Ledesma, Javier Bartolomé, Gilda Carreño, Juan Antonio Quiroga, Rafael Selgas, Vicente Carreño.
- 3 American Transplantation Congress 2017:** Epidemiological and Clinical implication in kidney transplantation of occult hepatitis C virus infection. Carlos Jiménez, Teresa Olea, Inmaculada Castillo, Jesús Díez, María José Santana, María López-Oliva, Elena González, Rafael Selgas, Vicente Carreño
- 4 1ST PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine.** IBJ Plus. Vol 1, Special Issue 2, May 2018. ISSN: 2531-0151. Is HCV- RNA in Chronic Hepatitis C Recipients of Kidney Transplantation detected by Ultracentrifugation or in Peripheral Blood Mononuclear Cells, after antiviral treatment and Sustained Viral Response?. Teresa Olea, Carlos Jiménez, Inmaculada Castillo, María José Santana, Rafael Selgas and Vicente Carreño.
- 5 Congreso de la Sociedad Española de Nefrología 2018/ IX Congreso Iberoamericano de Nefrología.** ¿Se detecta el ARN del VHC por ultracentrifugación o en células mononucleares de sangre periférica en los receptores de trasplante renal con hepatitis crónica C después del tratamiento antiviral y respuesta viral sostenida. Teresa Olea, Carlos Jiménez, Inmaculada Castillo, María José Santana, Rafael Selgas, Vicente Carreño.
- 6 27th International Congress of the Transplantation Society 2018.** Occult hepatitis C virus in recipients of kidney transplantation: Prevalence and clinical implications. Carlos Jiménez, T.Olea, M.J. Santana, MO. López, I. Castillo, J. Bartolome, JA. Quiroga, MA Vaca, V. Carreño, R. Selgas.

Publicaciones:

- 1 Inmaculada Castillo, Jorge Martínez-Ara, Teresa Olea et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 2014; 86:619-24.
- 2 Teresa Olea, Inmaculada Castillo, Elena González et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Diabetic Nephropathy: Epidemiological and Clinical Implications. *World Journal of Research and Review (WJRR)* ISSN:2455-3956, Volume 3, Issue-6 December 2016, Pages 65-69.
- 3 Olea T., Castillo I., Jiménez C., Díez J., Bartolomé J., Santana M.J., López-Oliva , M.O., González E., Selgas R, Carreño., V. (2019) Epidemiological and clinical implications in Kidney Transplantation of occult Hepatitis C virus infection. *Arch Clin Nephrol* 5 (1): 009-014. DOI: 10.17352/acn.000036. ISN: 2581-3870.
- 4 Olea T., Castillo I., Jiménez C., Bartolomé J., Santana M.J., Quiroga J.A., Carreño V., Selgas R. (2019) Direct action antivirals are effective in the total eradication of HCV in renal transplants. *Ann Antivir Antiretrovir* 3 (1):001-005. DOI: 10.17352/aaa.000005. July 2019.

see commentary on page 466

High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies

Inmaculada Castillo^{1,7}, Jorge Martínez-Ara^{2,7}, Teresa Olea², Javier Bartolomé¹, Rosario Madero³, Eduardo Hernández^{4,5}, Carmen Bernis⁶, Ana Aguilar², Juan A. Quiroga¹, Vicente Carreño^{1,8} and Rafael Selgas^{2,5,8}

¹Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain; ²Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; ³Department of Biostatistics, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; ⁴Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁵REDinREN, Madrid, Spain and ⁶Department of Nephrology, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

The association of hepatitis C virus (HCV) infection and glomerulonephritis is well known. However, the relationship between immune-mediated glomerulonephritis and occult HCV, characterized by the presence of HCV-RNA in liver or in peripheral blood mononuclear cells in the absence of serological markers, is unknown. We tested this in 113 anti-HCV-negative patients; 87 with immune-mediated glomerulonephritis and 26 controls with hereditary glomerular nephropathies. All patients were serum HCV-RNA negative by conventional real-time PCR. Significantly, occult HCV-RNA (detectable viral RNA in peripheral blood mononuclear cells or in serum after ultracentrifugation) was found in 34 of 87 patients with immune-mediated glomerulonephritis versus 1 of 26 control patients. The serum creatinine levels were significantly higher in patients with immune-mediated glomerulonephritis with than in those without occult HCV (1.5 versus 1.1 mg/dl, respectively). A multivariate analysis adjusted for gender showed a significantly increased risk of occult HCV in patients with immune-mediated glomerulonephritis versus the controls (odds ratio of 13.29). Progression to end-stage renal disease tended to be faster in patients with immune-mediated glomerulonephritis and occult HCV than in the negative cases. Thus, occult HCV is strongly associated with immune-mediated glomerulonephritis and may have a role in the progression of the disease.

Kidney International (2014) **86**, 619–624; doi:10.1038/ki.2014.68; published online 19 March 2014

KEYWORDS: glomerulonephritis; hepatitis; occult HCV; PBMCs

Correspondence: Inmaculada Castillo, Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Guzmán el Bueno 72, 28015 Madrid, Spain.
E-mail: fehvtpa@fehv.org

⁷These two authors contributed equally to this work.

⁸These two authors contributed equally to this work.

Received 21 June 2013; revised 17 January 2014; accepted 23 January 2014; published online 19 March 2014

Hepatitis C virus (HCV) is a single-stranded RNA virus that replicates by the synthesis of a complementary RNA molecule (antisense HCV-RNA strand). Although liver is the main target for HCV infection, a significant proportion of the HCV-associated morbidity is due to extrahepatic pathologies.¹ These extrahepatic manifestations may occur due to a generalized autoimmunity induced by the virus or a direct action of HCV, as HCV-RNA has been detected in several extrahepatic cell types and organs including the kidney.^{2,3}

Different epidemiological studies have shown that HCV infection is closely associated with several chronic kidney diseases, such as type I membranoproliferative glomerulonephritis with and without cryoglobulinemia, type III membranoproliferative glomerulonephritis, and membranous nephropathy.^{4–6} The common feature of these HCV-associated renal diseases is the existence of HCV immune complexes in renal tissue.^{7–9}

The diagnosis of HCV infection is based on the detection of antibodies against HCV proteins (anti-HCV) and HCV-RNA in serum.¹⁰ However, the use of highly sensitive nucleic acid amplification assays has demonstrated the presence of HCV-RNA in serum of some anti-HCV-negative patients. This status, termed 'seronegative' HCV infection, was found not only in certain clinical conditions such as HIV infection and hemodialysis but also in cryptogenic hepatitis and in blood and organ donors.^{11–20} Another form of seronegative HCV infection named occult HCV was identified in patients with chronic liver disease of unknown origin.²¹ This occult HCV infection is characterized by the detection of HCV-RNA in liver in the absence of anti-HCV and HCV-RNA in serum even on using highly sensitive techniques. Furthermore, a proportion of patients with occult HCV may have HCV-RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and very low levels of serum HCV-RNA may be detected after ultracentrifugation of large volumes of serum to concentrate viral particles.²² These approaches can be useful for the diagnosis of occult HCV when a liver biopsy is not available. Using

these techniques, occult HCV infection was also described in cryptogenic liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, lymphoproliferative disorders, hemodialysis patients with abnormal values of liver enzymes of unknown origin, and even in healthy subjects without evidence of hepatic disease.²³⁻²⁹

On the basis of the above premises, this study aimed to determine the prevalence and the possible clinical significance of occult HCV infection in a population of anti-HCV-negative patients with immune-mediated glomerulonephritis (IMGN).

RESULTS

This prospective study included a total of 113 adult patients with glomerulonephritis who were divided into two groups. One of the groups comprised 87 cases with IMGN (65 patients with primary and 22 with secondary glomerulonephritis) and the other group (control group) had 26 patients

with hereditary glomerular nephropathies (HGN) (Table 1). When comparing the demographic and clinical features of the two groups of patients included in the study, it was found that the proportion of women (20/26; 77%) and the duration of the renal disease (233 ± 99.5 months) were significantly higher in the group of patients with HGN than in patients with IMGN (45/87; 52%, *P* = 0.025 and 103.8 ± 91.5 months, *P* = 0.001, respectively). By contrast, the number of patients who reported risk factors for acquisition of HCV infection (blood transfusions, tattoos or piercings, or household contact with a chronic HCV carrier) was significantly higher (*P* = 0.007) in the IMGN group (25/87; 29%) than in the control group (1/26; 4%). No other differences were found between both groups of patients (Table 2).

Serum HCV-RNA was tested by conventional real-time PCR (with 250 µl of serum) in the 113 patients and all of them were negative. When detecting sense HCV-RNA strand in PBMC samples, it was found that 29/87 (33%) patients with IMGN who were serum HCV-RNA negative by conventional PCR technique had HCV-RNA in PBMCs with a mean load ± s.e.m. of 4.7 × 10⁴ ± 1.7 × 10⁴ copies/µg of total RNA. In 17 of these 29 patients (59%) the antisense HCV-RNA strand (HCV replication) was also detected in PBMCs (mean ± s.e.m.: 2.6 × 10³ ± 1.8 × 10³ copies/µg of total RNA). In addition, HCV-RNA was detected in serum after ultracentrifugation in another five additional patients (mean ± s.e.m.: 99 ± 16 copies/ml). No patient was simultaneously positive for HCV-RNA in PBMCs and in serum after ultracentrifugation. Thus, an occult HCV infection (HCV-RNA in PBMCs or in serum after ultracentrifugation) was diagnosed in 34/87 (39%) anti-HCV-negative patients with IMGN. By contrast, occult HCV infection was identified only in PBMCs of 1/26 (3.8%) patients with HGN (*P* = 0.001). All the negative controls included in the PCR assays were always negative and the results of HCV-RNA detection performed in a blind fashion by different operators on different days were identical in all cases.

The sequence analysis of the HCV-core region isolated from PBMCs of seven randomly selected patients and from serum (after ultracentrifugation) of two other patients showed that HCV isolates belonged to genotype 1b. The phylogenetic tree proved that, in each patient, HCV clones clustered together into the same branch but separately from

Table 1 | Demographic and clinical characteristics of the 113 patients

Age (year; mean ± s.d.)	49.3 ± 17.8
Female (n (%))	65 (57.5)
Duration of renal disease (months; mean ± s.d.)	133.5 ± 107.8
Serum creatinine (mg/dl; mean ± s.d.)	1.36 ± 1.27
Creatinine clearance (ml/min per 1.73 m ² ; mean ± s.d.)	88.6 ± 42.9
Cockcroft-Gault (ml/min; mean ± s.d.)	83.6 ± 40.1
Primary glomerular nephropathy (n (%))	
Idiopathic nephrotic syndrome ^a	26 (23)
Membranous nephropathy	20 (17.7)
Immunoglobulin A nephropathy	14 (12.4)
Membranoproliferative glomerulonephritis ^b	3 (2.6)
Immunotactoid nephropathy	2 (1.8)
Secondary glomerular nephropathy (n (%))	
Lupus nephropathy	15 (13.3)
Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis	7 (6.2)
Hereditary glomerular nephropathy (n (%))	
Alport syndrome	13 (11.5)
Thin basement membrane disease	8 (7.1)
Benign familial hematuria	5 (4.4)

^aIncludes minimal change nephrotic syndrome, focal and segmental glomerulosclerosis, and IgM nephropathy.

^bTypes I, II, and III; normal values for serum creatinine ≤ 1.3 mg/dl; normal values for Cockcroft-Gault > 90 ml/min.

Table 2 | Demographic and clinical features of the two groups of patients

	Immune-mediated glomerulonephritis (n = 87)	Hereditary glomerular nephropathy (n = 26)	<i>P</i>
Age (year; mean ± s.d.)	49.8 ± 18.6	47.6 ± 14.5	0.577
Female (n (%))	45 (52)	20 (77)	0.025
Duration of renal disease (mo.; mean ± s.d.)	103.8 ± 91.5	232.8 ± 99.5	0.001
Serum creatinine (mg/dl; mean ± s.d.)	1.24 ± 0.7	1.78 ± 2.3	0.055
Creatinine clearance (ml/min per 1.73 m ² ; mean ± s.d.)	87.5 ± 41.7	92.5 ± 47.7	0.611
Cockcroft-Gault (ml/min; mean ± s.d.)	82.7 ± 38	86.4 ± 47.2	0.694
Risk factors for acquisition of hepatitis C virus (n (%))	25 (29)	1 (4)	0.007

Normal values for serum creatinine ≤ 1.3 mg/dl; normal values for Cockcroft-Gault > 90 ml/min. Risk factors for acquisition of hepatitis C virus: blood transfusions, tattoos/piercings, household contact with a chronic hepatitis C virus carrier.

the HCV clones of the other patients, indicating that no cross-contamination among samples occurred (Figure 1).

By univariate analysis, it was found that the incidence of occult HCV infection was significantly higher in patients with

idiopathic nephrotic syndrome, membranous nephropathy, Immunoglobulin A nephropathy, lupus nephropathy, and anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis in comparison with patients with HGN (see Table 3).

In the group of IMGN patients, age, duration of the renal disease, levels of liver enzymes, and risk factors for acquiring HCV infection were comparable among patients with and without occult HCV infection (Table 4). However, the frequency of female gender was significantly lower ($P = 0.014$) in the group of patients with occult HCV (12/34: 35%) compared with that in the negative group (33/53: 62%). In addition, patients with occult HCV infection had significantly higher levels of serum creatinine compared with those without occult HCV (1.5 ± 0.9 vs. 1.1 ± 0.4 mg/dl, $P = 0.015$). Recorded data on the presence of rheumatoid factor were only available for 47 patients (19 of them with occult HCV), being positive in 1/19 (5%) cases with occult HCV infection and in 3/28 (11%) of those without occult HCV ($P = 0.638$). Cryoglobulins had been only tested in 11 patients (six with and five without occult HCV infection) and all of them were negative.

The multivariate analysis adjusted for gender revealed an increased risk of having an occult HCV infection in the group of patients with IMGN (odds ratio = 13.29; 95% confidence interval: 1.695–104.229; $P = 0.014$).

After 42.5 ± 8.5 months of the study entry, 81 patients with IMGN (30 with occult HCV infection) were still attending our Nephrology Departments. The remaining six patients (four with occult HCV) were lost for follow-up. Final serum creatinine levels did not differ significantly among patients with and without occult HCV infection (2.0 ± 1.9 vs. 1.4 ± 2.1 mg/dl, respectively), although creatinine clearance was significantly lower ($P = 0.032$) among patients with occult HCV (68.2 ± 45.1 ml/min per 1.73 m^2) than in those without occult infection (89.7 ± 39.6 ml/min per 1.73 m^2). However, the rate of renal function decline was comparable in both groups (data not shown). Relative to clinical outcome, the frequency of end-stage renal disease progression tended to be higher in patients with occult HCV (5/30:17%) compared with that in the negative ones (2/51: 4%) but with no statistically significant difference ($P = 0.062$). A total of 24 patients (seven with occult HCV infection) gave their consent to be retested for HCV-RNA in

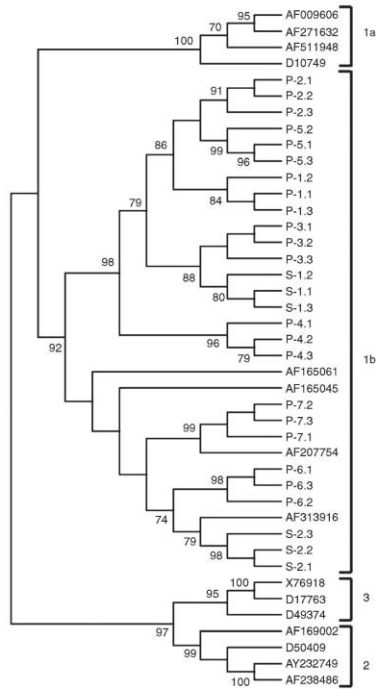


Figure 1 | Phylogenetic tree constructed with the hepatitis C virus (HCV)-core nucleotide sequences isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of seven randomly selected patients, designated by 'P', and from the serum, after ultracentrifugation, of two different patients, designated by 'S' (GenBank accession numbers KF889406-KF889432), and those corresponding to HCV genotypes 1, 2, and 3. Bootstrap values ≥ 70 obtained after 1000 replicates of the data sheet are shown in the nodes of the tree.

Table 3 | Prevalence of occult HCV infection according to the type of glomerulonephritis

	Number of patients	Occult HCV positive (%)	Odds ratio	95% Confidence interval	P
Idiopathic nephrotic syndrome ^a	26	8 (31)	11.11	1.28–96.86	0.029
Membranous nephropathy	20	8 (40)	16.67	1.97–148.90	0.012
Immunoglobulin A nephropathy	14	7 (50)	25.0	2.62–238.79	0.005
Membranoproliferative glomerulonephritis ^b	3	1 (33)	12.50	0.55–284.12	0.113
Immunotactoid nephropathy	2	0 (0)	0.00	0.00	0.999
Lupus nephropathy	15	7 (47)	21.88	2.33–205.78	0.007
Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis	7	3 (43)	18.75	1.54–227.78	0.021

^aIncludes minimal change nephrotic syndrome, focal and segmental glomerulosclerosis, and IgM nephropathy.

^bTypes I, II, and III.

Table 4 | Comparison of patients with and without occult hepatitis C virus infection in immune-mediated glomerulonephritis

	Immune-mediated glomerulonephritis		<i>P</i> ^a	Hereditary glomerular nephropathy (<i>n</i> = 26)
	Positive occult hepatitis C virus (<i>n</i> = 34)	Negative occult hepatitis C virus (<i>n</i> = 53)		
Age (year; mean ± s.d.)	51.6 ± 21.4	48.7 ± 16.7	0.502	47.6 ± 14.5
Female (<i>n</i> (%))	12 (35)	33 (62)	0.014	20 (77)
Duration of renal disease (months; mean ± s.d.)	100.2 ± 103.9	106.1 ± 83.6	0.774	232.8 ± 99.5
Serum creatinine (mg/dl; mean ± s.d.)	1.5 ± 0.9	1.1 ± 0.4	0.015	1.78 ± 2.3
Creatinine clearance (ml/min per 1.73 m ² ; mean ± s.d.)	78.6 ± 38	93.2 ± 42.8	0.113	92.5 ± 47.7
Cockcroft-Gault (ml/min; mean ± s.d.)	73.7 ± 38	88.5 ± 37.2	0.096	86.4 ± 47.2
Risk factors for acquisition of HCV (<i>n</i> (%))	12 (35)	13 (25)	0.279	1 (4)
Aspartate aminotransferase (IU/l, mean ± s.d.)	22.1 ± 6.2	21.0 ± 5.2	0.377	21.0 ± 11.5
Alanine aminotransferase (IU/l, mean ± s.d.)	20.4 ± 11	20 ± 9	0.825	20 ± 13.2
Gamma-glutamyl transpeptidase (IU/l, mean ± s.d.)	25.4 ± 12.8	34.6 ± 34.1	0.078	28.4 ± 35

Risk factors for acquisition of hepatitis C virus: blood transfusions, tattoos/piercings, household contact with a chronic hepatitis C virus carrier. Aspartate aminotransferase (normal value <40 IU/l); Alanine aminotransferase (normal value <40 IU/l); gamma-glutamyl transpeptidase (normal value <45 IU/l); normal values for serum creatinine ≤1.3 mg/dl; normal values for Cockcroft-Gault >90 ml/min.

^a*P*-values corresponding to the comparison of immune-mediated glomerulonephritis patients with and without occult hepatitis C virus.

PBMCs and in serum after ultracentrifugation. This HCV-RNA detection was also done in a blinded fashion. The 17 patients without occult HCV remained HCV-RNA negative, both in PBMCs and in serum after ultracentrifugation. Of the seven patients with occult HCV, initially, one had viral RNA in serum (after ultracentrifugation) and the other six patients were HCV-RNA positive in PBMCs. In the follow-up sample, all the seven patients were HCV-RNA negative in serum after ultracentrifugation. However, viral RNA was detected in the PBMCs of the seven patients, confirming the presence of an occult HCV infection.

DISCUSSION

Previous reports have shown an association between HCV infection and glomerulonephritis.⁴⁻⁶ The routine laboratory diagnosis of this HCV-related glomerulonephritis is based on the presence of conventional HCV-serological markers (anti-HCV and HCV-RNA). However, in the past years, the existence of occult HCV infection (presence of viral RNA in liver and in PBMCs with undetectable anti-HCV and serum HCV-RNA) has been documented in different populations, including patients with cryptogenic hepatitis, hemodialysis patients, and healthy subjects without evidence of liver disease.^{21,23-29}

This work was aimed to investigate the prevalence of occult HCV infection in anti-HCV and serum HCV-RNA-negative patients with IMGN. We have found that 39% of these patients had an occult HCV infection, as demonstrated by the detection of HCV-RNA in PBMCs or in serum after ultracentrifugation. The PCR results were considered reliable because (i) the large number of negative controls included in each PCR run were always negative, (ii) laboratory personnel were blinded to the clinical status of patients and identical results were obtained by different operators when testing the samples on different days, and (iii) the results of the phylogenetic analysis performed after the amplification of the HCV-core region, which was a different region than that amplified for the assessment of HCV-RNA (the 5' noncoding

region) in all the samples included in the study. Finally, the presence of occult HCV infection was confirmed when repeating HCV-RNA detection in samples collected 42.5 ± 8.5 months after the initial ones.

The prevalence of occult HCV infection in patients with IMGN (39%) was significantly higher (*P* = 0.001) than that found in the group of patients with HGN (3.8%). Furthermore, the multivariate analysis showed that the risk of having an occult HCV infection was 13 times higher for patients with IMGN as compared with HGN, so all these data suggest that occult HCV infection is clearly associated with glomerular diseases.

In patients with classical HCV-associated glomerular nephropathies, the pathogenesis of the kidney lesion is related to the deposition of HCV immune complexes in the glomeruli.⁷⁻⁹ These immune complexes can be taken up by mesangial cells, where viral RNA can trigger the production of interferons and proinflammatory cytokines via Toll-like receptor 3-dependent and -independent mechanisms.^{30,31} Patients with occult HCV infection have neither detectable anti-HCV nor detectable serum HCV-RNA by conventional methods and therefore it could be argued that occult HCV infection does not have a role in the kidney injury of our studied patients. However, it has been reported that in an anti-HCV-positive patient with glomerulonephritis but negative to serum HCV-RNA for years, renal injury was likely to be virus-induced because of the presence of HCV-NS3 antigen in the kidney tissue of the patient.³² Moreover, a recent work describes detection of HCV antigens and visualization of HCV particles in the renal tissue of 1.8% of anti-HCV-negative patients with glomerulonephritis, although the status of HCV-RNA in serum or PBMCs is not provided.³³ This percentage of occult HCV is lower than that found in our study, but it should be considered that immunohistochemistry is a lesser sensitive technique than HCV-RNA detection. Therefore, taking together all these previously reported data and our results, it can be assumed that occult HCV infection may be the underlying cause of a

proportion of primary and secondary glomerular nephropathies with negative serological viral markers. Although in the present work immunohistochemistry or virologic detection in the kidney biopsies (as no properly stored material was available) were not performed, our data suggest a possible direct pathogenic role of occult HCV infection in the renal damage. In support of this hypothesis is the fact that IMGN patients with occult HCV infection had significantly worse renal function (serum creatinine levels and creatinine clearance values) than the IMGN patients without occult HCV. Although the renal function declining rate was similar between both groups, the frequency of progression to end-stage renal disease tended to be higher in patients with occult HCV than in the negative cases, indicating that occult HCV may be a negative prognostic factor, as occurs with the classical hepatitis C infection in patients with IMGM.³⁴ Finally, occult HCV infection could explain why interferon therapy is of benefit, inducing clinical and laboratory responses, in some HCV-negative patients with essential mixed cryoglobulinemia.^{35,36} Therefore, detection of occult HCV infection provides the rationale basis for administration of antiviral therapy in anti-HCV-negative glomerular nephropathies.

In summary, occult HCV infection may be involved in the pathogenesis of a significant proportion of IMGN but further studies and a long-term follow-up of these patients must be performed to confirm the clinical and pathological implications of this finding.

MATERIALS AND METHODS

From June 2009 to January 2012, 87 patients with primary and secondary glomerular nephropathies and 26 patients with hereditary glomerular nephropathy were enrolled in the study. The diagnosis of the renal disease was based on a kidney biopsy, except for the cases of benign familial hematuria diagnosed by clinical and familial data. All patients had to be anti-HCV-negative, as well as hepatitis B surface antigen and anti-HIV negative by routine commercial tests (VITROS Anti-HCV Assay, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ; Enzygnost hepatitis B surface antigen 5.0 and Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). The study was approved by the Ethic Committee of the Hospital Universitario La Paz and was conducted according to the Declaration of Helsinki. A written informed consent was obtained from each patient.

Laboratory procedures

Blood samples were collected from all patients at the time of entry into the study. Upon arrival of the blood to the laboratory, serum samples were obtained from clotted blood, made into aliquots, and stored at -80°C , whereas PBMCs were isolated from anticoagulated blood by Bicolll (Biochrom, Berlin, Germany) density gradient centrifugation and stored at -20°C in RNAlater solution (Ambion, Austin, TX). HCV-RNA detection was performed over the inclusion period by laboratory personnel who were blinded to the clinical status of the patients. Each PCR run included a maximum number of six samples along with negative controls (repeatedly HCV-RNA-negative sera and PBMC samples from five healthy volunteers) and reagent blanks in which total RNA was replaced

with PCR-grade water. All negatives controls were co-prepared with the samples and accompanied the samples through the entire PCR process. In addition, to avoid PCR contamination, the guidelines of Kwok and Higuchi³⁷ were strictly observed. Finally, all HCV-RNA-positive samples, as well as randomly selected negative samples were retested again on different days by another person who was blinded to previous PCR results.

HCV-RNA detection

Total RNA was extracted from 250 μl of serum using Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), and after precipitation the pellet was dissolved in diethyl-pyrocabonate water. Another 2 ml of the serum was ultracentrifuged over a 10% sucrose cushion at $100,000\times g$ for 17 h at 4°C . The pellet was dissolved in 250 μl of TE buffer (Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 10 mmol/l; pH 7.5); total RNA was isolated with Trizol LS Reagent (Invitrogen), precipitated, and the pellet dissolved in diethyl-pyrocabonate-treated water. Total RNA from PBMCs was isolated with SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). After precipitation, pellets were dissolved in diethyl-pyrocabonate-treated water and RNA concentration was determined by spectrophotometry.

The detection of the 5' noncoding region of the sense HCV-RNA strand (using 5 μl of total RNA isolated from 250 μl of serum or from 2 ml of ultracentrifuged serum, or using 0.5 μg of total RNA from PBMCs) and of the antisense HCV-RNA strand (in PBMC), was performed by a strand-specific real-time RT-PCR using the thermostable enzyme Tth for the synthesis of the corresponding cDNA at high temperature as described.²² Real-time PCR was performed with FRET probes in a LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with 2 μl of cDNA in a final volume of 20 μl , using the LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics), as reported.²² A standard curve constructed with 10-fold dilutions of a synthetic HCV-RNA of sense polarity was used for quantification of sense HCV-RNA strand in PBMCs and in serum. As reported before, the sensitivity of this assay was of three HCV-RNA copies per reaction.²²

Sequence analysis

To further assure the specificity of the results, partial amplification of the HCV-core gene (302 nucleotides) was performed as described²¹ in total RNA isolated from PBMCs of seven randomly selected patients with occult HCV infection and from the serum, after ultracentrifugation, of two other patients. PCR products were cloned into the pCR II TOPO vector (Invitrogen) and clones were automatically sequenced. Nucleotide sequences of HCV genotypes 1-3 were retrieved from GenBank and a phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method using the MEGA software version 4.0.³⁸ The data set was bootstrap-resampled 1000 times to ascertain support for major branches of the tree.

Statistical analysis

Categorical variables were compared using chi-squared test or the Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables were compared using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney's *U*-test. A multivariate logistic regression analysis was performed to determine independent associated factors of the absence or presence of occult HCV infection.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

To Elena Olivas who helped to formulate this hypothesis. We thank Mar Viejo, Teresa Pulido, and Silvia Llorente, who have contributed to sample collection and handling. This work was funded by grant PI 10/02407 from the Fondo Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Spain.

REFERENCES

- Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; **8**: 1017-1029.
- Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; **44**: 5-22.
- Rodríguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J et al. Hepatitis C virus RNA in kidney biopsies from infected patients with renal diseases. *J Viral Hepat* 2000; **7**: 23-29.
- Johnson RJ, Gretsch DR, Yamabe H et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; **328**: 465-470.
- Latt N, Alachkar N, Gurakar A. Hepatitis C virus and its renal manifestations: a review and update. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2012; **8**: 434-445.
- Kamar N, Izopet J, Afric L et al. Hepatitis C virus-related kidney disease: an overview. *Clin Nephrol* 2008; **69**: 149-160.
- Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 227-236.
- Barsoum RS. Hepatitis C virus: from entry to renal injury—facts and potentials. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 1840-1848.
- Sansonno D, Lauletta G, Nisi L et al. Non-enveloped HCV core protein as constitutive antigen of cold-precipitable immune complexes in type II mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**: 275-282.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; **49**: 1335-1374.
- Chamie G, Bonacini M, Bangsberg DR et al. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 577-583.
- Hadlich E, Alvarez-Da-Silva MR, Dal Molin RK et al. Hepatitis C virus (HCV) viremia in HIV-infected patients without HCV antibodies detectable by third-generation enzyme immunoassay. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**: 1506-1509.
- Schmeberger PM, Keur J, van Loon AM et al. The prevalence and incidence of hepatitis C virus infections among dialysis patients in the Netherlands: a nationwide prospective study. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1291-1299.
- Hanuka N, Sikuler E, Tovbin D et al. Hepatitis C virus infection in renal failure patients in the absence of anti-hepatitis C virus antibodies. *J Viral Hepat* 2002; **9**: 141-145.
- Schmidt WN, Wu P, Cederna J et al. Seropositive hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. *J Infect Dis* 1997; **176**: 27-33.
- Zanetti AR, Tanzi E, Zehender G et al. Hepatitis C virus RNA in symptomless donors implicated in post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; **336**: 448.
- Villa E, Ferretti I, De Palma M et al. HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in post-transfusion hepatitis (PTH). *J Hepatol* 1991; **13**: 256-259.
- Brojer E, Gronowska A, Medyriska J et al. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004; **44**: 1706-1710.
- Challine D, Pellegrin B, Bouvier-Alias M et al. HIV and hepatitis C virus RNA in seronegative organ and tissue donors. *Lancet* 2004; **364**: 1611-1612.
- Tugwell BD, Patel PR, Williams IT et al. Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann Intern Med* 2005; **143**: 648-654.
- Castillo I, Pardo M, Bartolomé J et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004; **189**: 7-14.
- Bartolomé J, López-Alcorocho JM, Castillo I et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol* 2007; **81**: 7710-7715.
- Bokharai-Salim F, Keyvani H, Monavari SH et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. *J Med Virol* 2011; **83**: 989-995.
- Keyvani H, Bokharai-Salim F, Monavari SH et al. Occult hepatitis C virus infection in candidates for liver transplant with cryptogenic cirrhosis. *Hepat Mon* 2013; **13**: e11290.
- Hernandez BY, Zhu X, Kwee S et al. Viral hepatitis markers in liver tissue in relation to serostatus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; **22**: 2016-2023.
- Farahani M, Bokharai-Salim F, Ghane M et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with lymphoproliferative disorders. *J Med Virol* 2013; **85**: 235-240.
- Barril G, Castillo I, Arenas MD et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 2288-2292.
- De Marco L, Gillio-Tos A, Fiano V et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One* 2009; **4**: e8128.
- De Marco L, Manzini P, Trevisan M et al. Prevalence and follow-up of occult HCV infection in an Italian population free of clinically detectable infectious liver disease. *PLoS One* 2012; **7**: e43541.
- Allam R, Lichtnekert J, Moll AG et al. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 1986-1996.
- Wörmlé M, Schmid H, Banas B et al. Novel role of Toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2006; **168**: 370-385.
- Bataille S, Kaplanski G, Boucraut J et al. Membranoproliferative glomerulonephritis and mixed cryoglobulinemia after hepatitis C virus infection secondary to glomerular NS3 viral antigen deposits. *Am J Nephrol* 2012; **35**: 134-140.
- Kong D, Wu D, Wang T et al. Detection of viral antigens in renal tissue of glomerulonephritis patients without serological evidence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Int J Infect Dis* 2013; **17**: e535-e538.
- Perico N, Cattaneo D, Bikbov B et al. Hepatitis C infection and chronic renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 207-220.
- Casato M, Lagana B, Pucillo LP et al. Interferon for hepatitis C virus-negative type II mixed cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1386-1387.
- Casato M, Lilli D, Donato G et al. Occult hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia. *J Viral Hepat* 2003; **10**: 455-459.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; **339**: 237-238.
- Tamura K, Dudley J, Nei M et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Bio Evol* 2007; **24**: 1596-1599.

Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Diabetic Nephropathy: Epidemiological and Clinical Implications

Teresa Olea, Inmaculada Castillo, Elena González, Lucia Rodríguez-Gayo, Javier Bartolomé, Marco Vaca, Juan Antonio Quiroga, Rosario Madero, Rafael Selgas, Vicente Carreño

Abstract— Background: A high prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection in patients with diabetic kidney disease (DKD) has been reported. However, the epidemiology and relationship between DKD and occult HCV infection (OCI) are unknown. Objectives: To determine the prevalence of OCI in a population without conventional markers of HCV infection diagnosed with DKD, and to study its possible clinical implications. Study design: This prospective study included 125 anti-HCV and serum HCV-RNA-negative patients with DKD for the presence of OCI. HCV-RNA was tested by real-time reverse transcription PCR in peripheral blood mononuclear cells and in plasma after ultracentrifugation. Results: OCI was positive in 10 patients (8%). The patients with OCI had significantly higher ferritin levels ($p=0.002$) and monoclonal gammopathy (30% [3/10] vs. 0.87% [1/115] than the patients without OCI [$p=0.003$]). We found similar plasma ALT and GGT levels and HbA1C in both groups. At the end of the follow-up, the progression rate of renal disease tended to be faster in the group with OCI relative to the negative one, but without a significant difference. We did not find an association between OCI and cardiovascular morbidity. Conclusions: There was an 8% prevalence of OCI in patients with chronic renal failure secondary to DKD, higher than in the general population. This occult infection does not appear to play a role in the control of diabetes, cardiovascular risk or steatosis. However, the progression rate of renal disease tended to be faster, and the incidence of associated monoclonal gammopathy was significant.

Index Terms— Diabetes Kidney Disease, Type 2 diabetes mellitus, Occult hepatitis C virus.

I. INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) and hepatitis C virus

Teresa Olea, Nephrology Department, Hospital Universitario La Paz, REDinREN, Madrid, Spain.

Inmaculada Castillo, Foundation for the Study of Viral Hepatitis, Madrid, Spain

Elena González, Nephrology Department, Hospital Universitario La Paz, REDinREN, Madrid, Spain.

Lucia Rodríguez-Gayo, Nephrology Department, Hospital Universitario La Paz.

Javier Bartolomé, Foundation for the Study of Viral Hepatitis, Madrid, Spain.

Marco Vaca, Nephrology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

Juan Antonio Quiroga, Foundation for the Study of Viral Hepatitis, Madrid, Spain.

Rosario Madero, Department of Biostatistics, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

Rafael Selgas, Nephrology Department, Hospital Universitario La Paz, Professor at Universidad Autónoma de Madrid, REDinREN, Madrid, Spain.

Vicente Carreño, Foundation for the Study of Viral Hepatitis, Madrid, Spain.



(HCV) are two major public health problems worldwide. Previous reports have shown a high prevalence of HCV infection in patients with diabetic kidney disease (DKD) [1,2]. The association between these two diseases is a matter of debate [3]. On one hand, this association is supported by two meta-analyses [4,5], longitudinal studies, and by described pathophysiological mechanisms by which HCV infection causes insulin resistance [6–10]. Both entities share metabolic complications such as resistance to insulin, fatty liver, subclinical inflammation and perhaps cardiovascular disease, resulting in a significant increase in morbidity and premature mortality [3]. On the other hand, a recent cohort study of 15,128 American patients (NHANES) has challenged this dogma because it found that the prevalence of diabetes or prediabetes was not associated with HCV infection status [11].

Occult HCV infection (OCI) is characterized by the presence of HCV-RNA in the liver or in peripheral blood mononuclear cells in the absence of serological markers [12]. Complementary studies have demonstrated that OCI can also be diagnosed by concentrating 2ml of serum by ultracentrifugation, followed by HCV-RNA detection by real-time PCR [13]. OCI, as a state of nonapparent but real HCV infection, could explain these differences between HCV infection and T2DM. Furthermore, our group has demonstrated an association between OCI and a large spectrum of immune-mediated glomerular diseases, including a role in the progression of the disease [14].

II. OBJETIVES

We have aimed to better understand the epidemiological and clinical implications of OCI in a population of T2DM and DKD. We also reviewed the progression of DKD according to OCI status, and its association with steatosis, diabetes control and cardiovascular complications.

A. Study design

This prospective study included 125 adult patients visiting the nephrology department due to DKD between 2012 and 2013. Diabetes was defined using the standard American Diabetes Association criteria, and was confirmed by laboratory testing. DKD was characterized as long-term diabetes with albuminuria (ratio of albumin to creatinine >30 mg/g), impaired renal function (estimated glomerular filtration rate [eGFR] <60 ml/minute per 1.73 m²), or both. Other nephropathies were ruled out by an expert

nephrologist. All the included patients tested negative for anti-HCV, hepatitis B surface antigen and anti-HIV using a routine commercial test (INVITROS Anti-HCV Assay, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ; Enzygnost hepatitis B surface antigen 5.0 and Enzygnost Anti-HIV ½ Plus Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany).

The study was approved by the Research Ethics Committee of University Hospital La Paz and was conducted according to the Declaration of Helsinki. Each patient provided written informed consent and was then tested for occult HCV infection. An average follow-up of 17.5 ± 9 months was used to explore outcomes of kidney function and incidence of cardiovascular complications. Demographic, epidemiological, clinical and laboratory parameters of the 125 patients with DKD at OCI testing are shown in Table 1.

Hematuria was defined as a red blood cell count greater than 5 per high-power field in urinary sediment. Waist circumference ≤ 102 cm for men and ≤ 88 cm for women were considered normal. Previous blood transfusions, surgical procedures, household contacts and partners diagnosed with HCV infection, as well as the presence of a tattoo or piercing were recorded as potential risk factors for HCV infection

Table 1: Demographic and clinical characteristics of the patients at inclusion.

Age (years; mean ± SD)	73.7±10.04
Male (n, %)	115, 92
Type of diabetes: (n, %)	
I	10, 8
II	115, 92
Risk Factors for HCV infection: (n, %)	
Previous blood transfusion	35, 28
Tattoo/drug addiction	2, 1.6
Household HCV contact	2, 1.6
HBV infection (n, %)	9, 15
ALT (IU/L; mean ± SD)	24.3 ± 23.4
AST (IU/L; mean ± SD)	43.2 ± 22
GGT (IU/L; mean ± SD)	47.8 ± 66.7
Creatinine (mg/dl)	1.91 ± 0.83
Creatinine clearance (ml/min per 1.73 m ²)	44.2 ± 26.8
Proteinuria (g/24h)	1.24 ± 1.86

HBV: hepatitis B virus; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; GGT: gamma-glutamyl transferase

B. HCV-RNA detection

Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from anticoagulated blood samples collected from all patients at the time of inclusion in the study. The plasma samples were stored at -80°C and the PBMCs at -20°C in RNAlater solution (Ambion, Austin, TX) until detection of HCV-RNA.

Two milliliters of plasma were ultracentrifuged over a 10% sucrose cushion for 17 h at 100,000 x g and 4°C to concentrate HCV particles [13]. The pellet was dissolved in TE buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM; pH 7.5). Total RNA was isolated with the Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), then precipitated, and the RNA pellet was dissolved in diethyl-pyrocyanate-treated water. Total RNA from the PBMCs was isolated with SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). After precipitation, the pellets were dissolved in diethyl-pyrocyanate-treated water,

and the RNA concentration was determined by spectrophotometry.

Detection of HCV-RNA was performed using 5 µl of total RNA isolated from 2ml of ultracentrifuged plasma or using 0.5 µg of total RNA from PBMCs by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the Tth enzyme for cDNA synthesis as described [13]. Real-time PCR was performed with FRET probes in a LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with 2 µl of cDNA in a final volume of 20 µl, using the LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics), as reported [13]. For HCV-RNA quantification, a standard curve constructed with 10-fold dilutions of a synthetic HCV-RNA was used. The sensitivity of this assay was of three HCV-RNA copies per reaction [13].

Negative controls (repeated HCV-RNA-negative plasma and PBMC samples from four healthy volunteers) and reagent blanks, in which total RNA was replaced with PCR-grade water, were included in each PCR run. All these negative controls were coprepared with the samples and accompanied the samples through the entire RT-PCR process.

C. Statistical analysis

The categorical variables were compared using the chi-squared test or Fisher's exact test, as appropriate. The continuous variables were compared using Student's t-test or the Mann-Whitney U-test.

III. RESULTS

Of the 125 studied patients, 7 tested positive for the presence of HCV-RNA in PBMCs, with a median concentration of 1980 HCV-RNA copies per µg total RNA (range 110–4820). In addition, HCV-RNA was detected in plasma after ultracentrifugation of 2 ml of plasma in another three patients at concentrations of 120, 135 and 140 HCV-RNA copies per ml plasma. No patient was simultaneously positive for HCV-RNA in PBMCs and in plasma after ultracentrifugation. Thus, we found a prevalence of OCI in our series of 10/125 (8%); these patients had detectable viral RNA in PBMCs or in plasma after ultracentrifugation despite the absence of anti-HCV antibodies.

Table 2 displays the demographic characteristics, clinical features and cardiovascular risk factors of the two groups of patients with DKD according to the presence or not of OCI. Most of the variables were similar.

Table II: Demographic, clinical and analytical data according to occult negative/positive HCV infection.

	Occult negative HCV infection (n = 115)	Occult positive HCV infection (n=10)	Signif
Age (years, mean ± SD)	73.7 ± 10	74.9 ± 8.6	
Male (n, %)	78, 70.9	60, 61.3	
Risk factors for acquisition of HCV (%)	1.4	1.1	
Smoking (n, %)	7, 11.8	2, 9.5	
Systolic blood pressure (mmHg)	134.6 ± 12.1	135.5 ± 22.6	
Diastolic blood pressure (mmHg)	64.0 ± 17.9	66.8 ± 10.9	
BMI (kg/m ²)	31.7 ± 6.5	30.8 ± 6	
Waist circumference (cm)	114.5 ± 13.3	107.1 ± 14	
Cholesterol (mg/dl)	140.4 ± 27.1	147.6 ± 33.1	
HbA1C (%)	7.1 ± 1.31	6.6 ± 0.70	
Myocardial infarction (n, %)	23, 20.9	2, 20	
Cerebrovascular ischemia (n, %)	12, 10.9	1, 10	

HCV: hepatitis C virus, BMI: body mass index; HbA1c: hemoglobin glycosylate.

At the beginning of the follow-up, plasma levels of liver enzymes, renal function and proteinuria were the same for both groups; however, a significantly higher plasma ferritin level (mean ± SD: 325.8 ± 194.4 ng/ml) in patients with OCI was demonstrated (patients with no OCI showed 139.1 ± 136.8 ng/ml; p=.002). The number of patients who reported risk factors for acquisition of HCV infection (blood transfusions, tattoos or piercings, or household contacts with a chronic HCV carrier) was similar in both groups. At the end of the follow-up (mean ± SD: 17.5 ± 9 months), there was no difference in plasma levels of liver enzymes, diabetes control, cardiovascular events (myocardial infarction or cerebrovascular ischemia), renal function and proteinuria, as shown in Table 3.

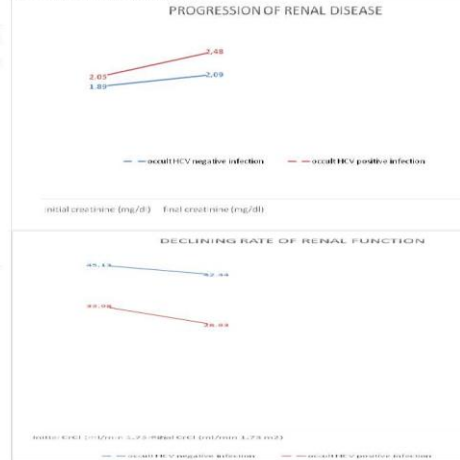
Table III: Kidney and liver parameters at the end of the follow-up.

	Occult negative HCV infection (n=115)	Occult positive HCV infection (n=10)	Significance
Serum creatinine (mg/dl, mean ± SD)	2.1 ± 1.1	2.5 ± 1.3	0.282
CrCl (ml/min per 1.73 m ² , mean ± SD)	42.4 ± 23.4	28.8 ± 15	0.076
Proteinuria (g/24 h, mean ± SD)	1.3 ± 1.8	0.5 ± 0.5	0.179
Hematuria (n, %)	13, 11.8	1, 1	0.67
ALT (U/L, mean ± SD)	22.1 ± 11.4	16.6 ± 4.5	0.136
GGT (U/L, mean ± SD)	50.9 ± 39.9	29.7 ± 24.2	0.271
Ferritin (ng/ml, mean ± SD)	150.2 ± 130.8	163.2 ± 81.4	0.02*

ALT: alanine aminotransferase
GGT: gamma-glutamyl transpeptidase

Although there were no significant differences in the liver and kidney parameters, the renal function decline rate tended to be more rapid in the group with OCI, as demonstrated by plasma creatinine and clearance values (Figure 1).

Figure 1: Evolution of renal function in patients with occult negative/positive HCV infection. (A) Initial and final plasma creatinine levels (mg/dl) (B) Initial and final creatinine clearance (ml/min/1.73 m²).



We did not identify an association between occult HCV infection and cardiovascular morbidity, but interestingly, we found that the patients with occult HCV infection had an incidence of 30% (3/10) monoclonal gammopathy vs. 0.87% (1/115) of the patients without OCI (p=.003), over the follow-up.

IV. DISCUSSION

OCI is a situation characterized by the absence of serological markers and the presence of HCV-RNA in the liver or in PBMCs. The presence of OCI has been documented in various populations, including patients with immune-mediated glomerulonephritis, cryptogenic hepatitis, NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) and lymphoproliferative disorders, as well as those undergoing hemodialysis, HIV-infected patients, drug users and the healthy population [12].

Previous studies from our group had reported a high prevalence of OCI in groups of chronic kidney disease patients (hemodialysis 45%, immune-mediated glomerulonephritis 39%) [14, 15]. The prevalence of anti-HCV in Spain is 1.7% (0.4%–2.6%) [16]. HCV infection detected by conventional serological markers is known to be highly prevalent in patients with DKD, reaching 19.5% [17, 18]. On these bases, this prospective study aimed to determine the prevalence of OCI and the possible clinical implications in a population of patients with DKD.

The prevalence of OCI found in patients with DKD in our study was 8%, as demonstrated by the detection of HCV-RNA in PBMCs or in plasma after ultracentrifugation—higher than that found in the group with hereditary glomerulonephritis (3.8%) [14]. In our study, risk factors for HCV infection were greater than those previously found in hereditary nephropathies (4%), and less than those described in immune-mediated glomerulonephritis.

Chronic HCV infection is recognizably associated with liver steatosis [19]. Both HCV and metabolic syndrome are frequent disorders, and there is the possibility of overlapping.

We did not find any difference in the liver parameters according to the presence of OCI. The only parameter we found with significant differences was serum ferritin, which could reflect liver inflammation.

The overweight patients were encouraged to reach ideal body weight because weight loss reduces liver steatosis and albuminuria and improves kidney function in patients with diabetes [20]. For most patients, glycated hemoglobin (A1C) goals were $\leq 7.0\%$ to avoid diabetic comorbidities. Although BMI and waist circumference tended to be higher in the OCI group, we did not find significant differences in the HbA1C insulin requirement for either group.

Whether HCV is an independent risk factor for cardiovascular disorders remains controversial [19]. The presence of HCV infection increased the risk of coronary artery disease in several studies [21–27]. In addition, two community-based studies found that HCV infection was an independent predictor of cerebrovascular death, and also noted an association between serum HCV RNA levels and cerebrovascular mortality, hinting at a dose effect mechanism [28]. Other studies, however, have failed to identify an association between HCV infection and cardiovascular morbidity [29–30]. We did not identify an association between OCI and cardiovascular morbidity, but we found that the patients with OCI had an incidence of 30% (3/10) monoclonal gammopathy vs. 0.87% (1/115) of the patients without OCI ($p=0.03$). The incidence of HCV infection and other non-hepatic malignancies was examined in a Swedish cohort of patients infected with HCV. The study showed that the risk of B-cell non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma were significantly increased [31]. OCI has also been described in patients with lymphoproliferative disorders, with a prevalence between 1.9% and 20% [32–33]. Another study reported that the HCV-NS3 antigen is frequently expressed in the lymph nodes of anti-HCV- and serum HCV-RNA-negative patients with non-Hodgkin's lymphoma, suggesting the possibility of OCI in these patients [34]. Although these findings remain to be confirmed, they suggest that HCV infection could be important in the pathogenesis of posttransplant lymphoproliferative disorder and other hematological malignancies. The lymphotropism of this virus could explain the relationship between infection by HCV and some lymphoproliferative disorders, particularly mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma [35]. In our cohort, it is difficult to establish a connection between OCI, DKD and monoclonal gammopathy, particularly given the small number of patients with OCI; but the remarkable incidence (30%) suggests new areas for research. The primary clinical manifestations of DKD are albuminuria, occasionally microscopic hematuria, and in many patients progressive kidney disease [36–38]. We did not find a higher prevalence of hematuria in the OCI group. At the end of the follow-up period, the progression of kidney disease tended to be more rapid in the group with occult HCV infection; however, the difference was not statistically significant. Proteinuria was similar in both groups, as was the use of RAAS therapy. Our group has also described the tendency for patients with immune-mediated glomerulonephritis and OCI to progress to end stage renal

disease more rapidly than patients OCI negative ones. [14]. One of the limitations of our study is the size of the series. However, the trends that are complementary with previous findings justify a preliminary recognition of these associations, specifically those related to the more rapid progression of kidney disease in patients with OCI.

V. CONCLUSIONS

In conclusion, for patients with chronic renal failure secondary to DKD, there is a lower prevalence (8%) of OCI compared with the prevalence in patients with immune-mediated glomerular nephropathies (39%), but OCI is higher than in the general population and in hereditary nephropathies [14]. These data indicate that the presence of OCI plays a limited role in the control of diabetes, cardiovascular risk or liver steatosis in these patients. In the group with OCI, however, the progression of renal disease tended to be more rapid than in the non-OCI group and showed a remarkable and unexpected prevalence of monoclonal gammopathy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants PI 11/00585 and PI 12/00204 from the Fondo Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain. Our group is also supported by FEDER Funds from the European Union as part of REDinREN (RETICS, ISCIII).

REFERENCES

- [1] Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jordi R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19: 998-1000.
- [2] Jadoon NA, Shahzad, MA, Yaqoob R, et al. Seroprevalence of hepatitis C in type 2 diabetes: evidence for a positive association. *Virology* 2010; 7: 304-309.
- [3] Cusi K. The relationship between hepatitis C virus infection and diabetes: time for a divorce? *Hepatology* 2014; 60:1121-3.
- [4] White DL, Ratzin V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008; 49:831-44.
- [5] Naing C, Mak JW, Ahmed SI, Maung M. Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes mellitus: meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1642-51.
- [6] Eslam M, Khattab MA, Harrison SA. Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story. *Gut* 2011; 60: 1139-1151.
- [7] Kawaguchi Y, Mizuta T. Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2088-2901.
- [8] Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165: 1499-1508.
- [9] Persico M, Russo R, Persico E, Svelto M, Spano D, Andolfo I, et al. SOCS3 and IRS-1 gene expression differs between genotype 1 and genotype 2 hepatitis C virus infected HepG2 cells. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1217-25.
- [10] Paziienza V, Vinciguerra M, Andriulli A, Mangia A. Hepatitis C virus core protein genotype 3^h increases SOCS7 expression through PPAR- α in Huh-7 cells. *J Gen Virol* 2010; 91: 1678-1686.
- [11] Ruhl CE, Menke A, Cowie CC, Everhart JE. Relationship of hepatitis C virus infection with diabetes in the U.S. population. *Hepatology* 2014; 60: 1139-49.
- [12] Carreño V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications. *J Clin Virol* 2014; 61:315-320.
- [13] Bartolome J, Lopez-Alcorocho, Castillo I, Rodriguez-Iñigo E, Quiroga JA, Palacios R, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81: 7710-5. doi:10.1128/JVI.02750-06.

- [14] Castillo I , Martinez-Ara J , Olea T , Bartolome J , Madero R, Hernandez E, et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 2014; 86: 619-24.
- [15] Barril G, Castillo I, Arenas MD, Espinosa M, Garcia-Valdecasas J, Garcia-Fernández N, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19:2288–2292.
- [16] Gower E , Estes C , Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 61:S45-S57.
- [17] Crook ED, Penumalee S, Gavini B, Filippova K. Hepatitis C is a predictor of poorer renal survival in diabetic patients. *Diabetes Care* 2005; 28: 2187-91.
- [18] Soma J, Saito T, Taguma Y, Chiba S, Sato H, Sugimura K, et al. High Prevalence and Adverse Effect of Hepatitis C Virus Infection in Type II Diabetic- Related Nephropathy. *J Am Nephrol Soc* 2000; 11: 690-699.
- [19] Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol* 2014; 61: S69-S78.
- [20] E. Morales, Valero MA, Leon M, et al. Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 319.
- [21] Vassalle C, Masini S, Bianchi F, Zucchelli GC. Evidence for association between hepatitis C virus seropositivity and coronary artery disease. *Heart* 2004; 90:565–566.
- [22] Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, Deveci B, Astan R, Celebi AS, et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J* 2008;72:1960–1965.
- [23] Marelli D, Bresson J, Laks H, Kubak B, Fonarow G, Tsai FC, et al. Hepatitis C positive donors in heart transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2:443–447.
- [24] Haji SA, Starling RC, Avery RK, Mawhorter S, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Donor hepatitis C-seropositivity is an independent risk factor for the development of accelerated coronary vasculopathy and predicts outcome after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:277–283.
- [25] Younossi ZM, Braun WE, Protiva DA, Gifford Jr RW, Straffon RA. Chronic viral hepatitis in renal transplant recipients with allografts functioning for more than 20 years. *Transplantation* 1999;67:272–275.
- [26] Butt AA, Xiaoqiang W, Budoff M, Leaf D, Kuller LH, Justice AC. Hepatitis C virus infection and the risk of coronary disease. *Clin Infect Dis* 2009;49:225–232.
- [27] Younossi ZM, Stepanova M, Nader F, Younossi Z, Elsheikh E. Associations of chronic hepatitis C with metabolic and cardiac outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:647–652.
- [28] Lee MH, Yang HI, Wang CH, Jen CL, Yeh SH, Liu CJ, et al. Hepatitis C virus infection and increased risk of cerebrovascular disease. *Stroke* 2010;41:2894–2900.
- [29] Völzke H, Schwahn C, Wolff B, Mentel R, Robinson DM, Kleine V, et al. Hepatitis B and C virus infection and the risk of atherosclerosis in a general population. *Atherosclerosis* 2004;174:99–103.
- [30] Arcari CM, Nelson KE, Netski DM, Nieto FJ, Gaydos CA. No association between hepatitis C virus seropositivity and acute myocardial infarction. *Clin Infect Dis* 2006; 43: e53–e56.
- [31] Kristiansen MG, Løchen ML, Gutteberg TJ, Mortensen L, Eriksen BO, Florholmen J. Total and cause-specific mortality rates in a prospective study of community-acquired hepatitis C virus infection in northern Norway. *J Viral Hepat* 2011; 18: 237–244.
- [32] Youssef SS, Nasr AS, El Zanaty T, El Rawi RS, Mattar MM. Prevalence of occult hepatitis C virus in Egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat Res Treat* 2012; 2012: 429784. doi: 10.1155/2012/429784.
- [33] Maryam Farahani, Farah Bokharaci- Salim, Masood Ghane, Alii Basi, Parisa Meysami and Hossein Keyvani. Prevalence of Occult Hepatitis C Virus Infection in Iranian Patients With Lymphoproliferative Disorders. *J Med Virol* 2013; 85 (2):235-40.
- [34] Ghada Mohamed El-sayed, Waleed Seif El-din Mohamed, Mohamed Akram Nouh, Manar Mohamed Moncer and Hadir Ahmed El-Mahallawy. Viral Genomes and Antigen Detection of Hepatitis B and C Viruses in Involved Lymph Nodes of Egyptian Non-Hodgkin's Lymphoma Patients. *Egypt J Immunol* 2006;13 (1):105-14.
- [35] Pena LR, Nand S, De Maria N, Van Thiel DH. Hepatitis C virus infection and lymphoproliferative disorders. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1854-1860.
- [36] Matsumura N, Hanatani M, Nishino T. The clinico-pathological significance of hematuria in diabetics. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1994; 36: 1036.
- [37] O'Neill WM , Wallin JD , Walker PD. Hematuria and red cell casts in typical diabetic nephropathy. *Am J Med* 1983; 74: 389.
- [38] Lopes de Faria JB , Moura LA , Lopes de Faria SR. Glomerular hematuria in diabetics. *Clin Nephrol* 1988; 30: 117.



CLINICAL GROUP



ISSN: 2581-3870 DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/acn>

Olea T^{1*}, Castillo I², Jiménez C¹, Díez J³, Bartolomé J², Santana MJ¹, López-Oliva MO¹, González E¹, Selgas R¹ and Carreño V²

¹Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ. Redinren. Irsin, Spain

²Fundación para el Estudio de Hepatitis Virales e Investigación Biomédica, Spain

³Department of Nephrology and Statistics, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ. Redinren. Irsin, Spain

Received: 27 May, 2019

Accepted: 09 July, 2019

Published: 10 July, 2019

*Corresponding author: Olea T, MD, Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046- Madrid, Spain, Tel: +34 658158233; E-mail: teresa.olea@salud.madrid.org

Keywords: Kidney transplantation; Occult hepatitis C virus

<https://www.peertechz.com>



Research Article

Epidemiological and clinical implications in Kidney Transplantation of occult Hepatitis C virus infection

Abstract

Occult Hepatitis C virus (HCV) infection (OCI) is characterized by the presence of HCV-RNA in liver or in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the absence of serological markers. HCV infection in kidney transplant (KT) recipients is associated with lower patient and graft survival. However, the relationship between KT outcome and OCI is unknown. Our aim was to determine in KT recipients the prevalence, risk factors for OCI, and its prognostic implications. We tested 149 adults KT recipients for the presence of OCI. HCV-RNA was tested by a RT-PCR in PBMC and in 2 ml of plasma after ultracentrifugation. OCI was positive in 21 patients (14.1%). Previous blood transfusion was a risk factor for acquiring OCI ($p=0.044$). Although there were no statistical differences in clinical complications post-KT and in the immunosuppression, graft and patient survival were worse in the OCI positive group ($p=0.02$ and $p=0.04$, respectively). In summary, there was a high prevalence of OCI in our KT population with previous blood transfusion as the main risk factor. Long-term graft and patient survival were reduced as compared to OCI negative recipients although the contribution of particular co-morbidities did not reach statistical significance.

Abreviations

ATG: Antitymocyte Immunoglobulin; CKD: Chronic Kidney Disease; DGF: Delayed Graft Function; HCV: Hepatitis C virus; HCV: RNA: Hepatitis C virus-Ribonucleic Acid; HIV: Human Immunodeficiency Virus; IMGN: Immune Mediated Glomerulonephritis; KT: Kidney Transplantation; mTOR: Mammalian Target of Rapamycin; NC: Non Coding; NODAT: New Onset Diabetes After Transplantation; OCI: Occult HCV Infection; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells; PTL: Post-Transplant Lymphoproliferative Disease; RT-PCR: Real Time Reverse Transcription;

Introduction

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection has been recognized as an important health problem in kidney transplant (KT) recipients, with a significantly higher prevalence than in general population [1]. The survival rate for HCV-infected KT recipients is better than that for HCV-infected hemodialysis patients on transplant waiting lists [2]. However, in KT recipients, HCV infection (often acquired because of dialysis treatment) is associated with liver disease and is an independent risk factor for graft loss, chronic rejection, transplant glomerulopathy, post-transplant diabetes and HCV-associated glomerulonephritis [3]. The increased risk of death in HCV-infected renal allograft

recipients has been attributed to cardiovascular mortality, linked somehow to the insulin resistance and high risk of new onset diabetes after transplantation (NODAT) rather than the progressive of HCV-related liver disease [4]. Determining the best immunosuppressive regimen after KT in the presence of HCV infection remains challenging as it has significant consequences on HCV replication and disease [5].

Occult HCV infection (OCI) is characterized by the presence of HCV-RNA in liver or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the absence of serological markers [6]. OCI may also be diagnosed by concentrating 2 ml of serum by ultracentrifugation followed by HCV-RNA detection by real-time PCR [7]. Our group has found a high prevalence of OCI in hemodialysis patients [8] and also in patients with primary and secondary glomerular nephropathies [9]. In both groups the presence of OCI was associated with a worse outcome including a potential role in the progression of the renal disease. To our knowledge, there is only one study reporting a low prevalence of OCI in KT recipients [10]. Thus, we aimed to determine the prevalence as well as the epidemiological and clinical implications of OCI in a Spanish population of KT recipients. In addition, we also studied the possible association of OCI with renal graft function, development of NODAT and cancer, opportunistic infections, kidney rejection and graft and patient survival

009

Citation: Olea T, Castillo I, Jiménez C, Díez J, Bartolomé J, et al. (2019) Epidemiological and clinical implications in Kidney Transplantation of occult Hepatitis C virus infection. Arch Clin Nephrol 5(1): 009-014. DOI: <http://dx.doi.org/10.17352/acn.000036>

Material and Methods

Patients

This prospective study included 149 patients attending a Nephrology consulting due to functioning KT, at different stages. All patients had to be anti-HCV and serum HCV-RNA negative as well as hepatitis B surface antigen and anti-HIV negative by routine commercial tests. We did not use HCV positive donor as in our center these are reserved for HCV infected recipients.

All patients had to be followed up after KT for a period longer than one year, and their vital prognostic had to be unaffected by any known process. Over 2015 and 2016, 149 adults, non-selected patients, were recruited. The study was approved by the Ethic Committee of the Hospital and was conducted according to the Declaration of Helsinki. Each patient gave a written informed consent and afterwards was tested for OCI. All the participants were followed-up as recommended by the European Best Practice Guidelines for renal transplantation [11]. Recommendations for prevention and treatment about infections, cardiovascular risk (obesity, smoking, hiperlipidaemia NODAT, hypertension) or cancer development (skin, solid organ and PTLD) were strictly followed. A follow-up period of (119.8 ± 77 months) was used to explore kidney function stability, needs of immunosuppression and the incidence of complications related with KT outcome. The last 24 months of this follow-up allowed the observation of all patients after OCI testing to explore its role on graft and patient survival.

Type and time on dialysis, previous blood transfusions, surgical procedures, household contacts and partners diagnosed of HCV infection, as the presence of tattoo or piercing were recorded as potential risk factors for HCV infection. The acute and chronic rejection had to be confirmed by a kidney graft biopsy. The delayed graft function (DGF) was defined as the need for dialysis the first week post-KT. The presence of NODAT was defined as the requirement of oral antidiabetics or insulin for a minimum period of 30 days post-KT. Opportunistic infections were registered in KT recipients, as well as infections due to organisms with microbiological resistance. The time until the loss of the graft was calculated from the date of the KT until the date of graft loss. The patient's survival was calculated from the KT until the date of death.

Methods

HCV- RNA detection in PBMC and in plasma samples: PBMC and plasma were isolated from anticoagulated blood by Biocoll (Biochrom, Berlin, Germany) density gradient centrifugation. Plasma was aliquoted and stored at -30°C. PBMC were washed three times in phosphate-buffered saline and stored in RNAlater solution (Ambion, Austin, TX) at -30°C.

Total RNA from PBMC was isolated with SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). After precipitation, pellets were dissolved in diethyl-pyrocyanate-treated water

and RNA concentration was determined by spectrophotometry. In addition, 2 ml of plasma were ultracentrifuged over a 10% sucrose cushion at 100,000 xg for 17 h at 4°C. The pellet was dissolved in 250 ml of TE buffer (Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 10 mmol/l; pH 7.5) and, total RNA was isolated with Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA.), precipitated, and the pellet dissolved in diethyl-pyrocyanate-treated water.

Amplification of the HCV-RNA 5' noncoding (NC) region was performed by quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR with fluorescence resonance energy transfer probes. Two microliters of total RNA isolated from 2 ml of ultracentrifuged plasma, or 0.5 µg of total RNA from PBMC were retrotranscribed and amplified in a single tube reaction containing RNA reaction mix (LightCycler Master Hyprobe, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), The conditions of this RT-PCR have been previously described [12-16]. A standard curve constructed with 10-fold dilutions of a synthetic HCV-RNA was used for quantification. The lower limit of HCV-RNA detection of the assay was 10 IU/ml (mean threshold cycle [Ct], 39.32) with a lower limit of quantification of 100 IU/ml (mean Ct, 35.64), as determined by testing serial dilutions of HCV-RNA positive serum sample, in which HCV-RNA quantification was previously assessed by an HCV test (Cobas TaqMan, Roche Diagnostics).

HCV-RNA detection was performed by laboratory personnel who were blinded to the clinical status of the patients. Each PCR run included a maximum number of 10 samples along with negative controls (repeatedly HCV-RNA negative sera and PBMC samples) and reagent blanks in which total RNA was replaced with PCR-grade water. Negative controls and blanks were processed with the samples and accompanied them through the entire PCR process. As positive controls, HCV-RNA positive sera and PBMC from patients with chronic HCV infection were used. The guidelines of Kwok and Higuchi [12], were strictly observed for avoiding contaminations. To further confirm OCI results, positive samples and randomly selected negative ones were tested again on different days by another person who was blinded to previous results.

Statistical analysis

The data were processed by a database in the program SPSS version 20, for its statistical treatment. For the description of continuous quantitative variables, the mean was used together with the standard deviation. Qualitative variables were described by absolute and relative frequencies expressed as a percentage. The comparisons between continuous quantitative variables between the two independent groups were performed primarily using a non-parametric (Mann-Whitney U Test) technique. For the analysis of frequencies between qualitative variables, the chi-square test or Fisher's exact test was used when possible. The analysis of the temporal evolution between moments of the quantitative variables was performed in paired form, by the Wilcoxon signed rank test. A Kaplan-Meier method and log-rank test were used to calculate kidney graft and patient survival. A P value <0.05 indicated statistical significance.

Results

Of the 149 KT receptors studied, 20 tested positive for the presence of HCV RNA in PBMC with an average concentration of 1727.35 copies per µg of total RNA (range 347-6810). HCV RNA was detected in the plasma after the ultracentrifugation of 2 ml of plasma in another patient at a concentration of 872 copies per ml of plasma. Positive results were obtained in different runs on different days, excluding intersample cross-contamination and the retesting of positive and negative samples in a blind fashion by different operators, confirmed the results. Therefore, we found a prevalence of occult HCV infection of 21/149 (14.1%); these patients had viral RNA detectable in PBMC or in plasma after ultracentrifugation despite the absence of anti-HCV antibodies.

When comparing demographic and clinical features (12 months after KT) of the patients according to their OCI status (Table 1) it was found that previous history of blood transfusion was significantly higher ($p=0.044$) in the OCI group (18; 94.7%) than in the negative one (9; 71.7%), (odds ratio=7.121; 95% confidence interval: 0.916-55.332).

At this first year of post KT follow-up, renal function and proteinuria were similar in both groups although plasma creatinine and proteinuria in the OCI positive group were mildly lower (1.44 ± 0.86 (mg/dl); 0.30 ± 0.30 (g/24h)) than

in the OCI negative group (1.58 ± 0.49 (mg/dl); 0.42 ± 0.65 (g/24h)). However, at the end of the whole follow-up period (119.8 ± 77 months), renal function tended to decline faster and proteinuria values were higher in the OCI positive group (1.93 ± 1.05 (mg/dl); 0.86 ± 1.14 (g/24h)), than in the OCI negative group, (1.74 ± 0.80 (mg/dl); 0.62 ± 1.38 (g/24h)), although these differences did not reach statistical significance ($p=0.44$ and 0.77).

Type of immunosuppression at induction therapy and once stabilized at the time of the study, did not differ between OCI positive and negative group (Table 2).

Clinical complications post-KT were similar in both group of patients (Table 3).

Graft loss occurred in 5/149 (3.3%) patients, being 2 of them OCI positive (Table 2). In 3 of these 5 patients (60%), transplant glomerulopathy was the cause of returning to dialysis programme (one patient was OCI positive). In the remaining 2 cases, it was due to development of myeloma multiple (patient with OCI) and pelvic cancer (OCI negative). During the follow-up, it was recorded a total of 7/149 (4.7%) exits. In the group of patients with OCI there was a trend of more deaths (3/21; 14.3%) than in negative ones (4/128; 3.1%) but without statistical difference ($p=0.06$) (Table 3). In the

Table 1: Demographic, epidemiological, clinical and analytical parameters of the patients at the study.

	Occult negative HCV infection	Occult positive HCV infection	Significance	Odds ratio	95% Confidence interval
	(N = 128)	(N=21)			
Age (years; mean \pm SD)	52.73 \pm 14.43	55.19 \pm 14.03	0.386		
Male (n; %)	83; 64.8	12; 57.1	0.625	0.723	0.283-1.845
Time on dialysis programme (months; mean \pm SD)	31.10 \pm 21.13	25.55 \pm 18.97	0.585		
Time of follow up after renal transplantation (months; mean \pm SD)	120 \pm 78.56	118.52 \pm 68.6	0.475		
Serum creatinine (mg/dl; mean \pm SD)	1.58 \pm 0.49	1.44 \pm 0.86	0.096		
Proteinuria (gr/24h; mean \pm SD)	0.42 \pm 0.65	0.30 \pm 0.30	0.247		
Risk factors for HCV infection: (n;%)					
Type of dialysis			0.520	N/A	N/A
Hemodialysis	52; 43.7	10; 55.6			
Peritoneal dialysis	44; 37	6; 33			
None	3; 2.5	0; 0			
Both	20; 16.8	2; 11.1			
Previous Blood Transfusion	91; 71.7	18; 94.7	0.044	7.127	0.916-55.332
Household HCV contact	0; 0	0; 0	0	N/A	N/A
Tattoo/drogadiction	11; 12.8	4; 25	0.247	2.273	0.622-8.310
HBV infection	19; 15.7	5; 27.8	0.199	2.065	0.659-6.467
Etiology of renal disease (n;%)					
Glomerular nephropathy	37; 29.8	1; 4.8	0.081	N/A	N/A
Hereditary nephropathy	35; 28.2	4; 19			
Systemic nephropathy	14; 11.3	5; 23.8			
Tubulointerstitial nephropathy	22; 17.7	5; 23.8			
Diabetic nephropathy	16; 12.9	6; 28.6			

HCV: Hepatitis C virus; HBV: Hepatitis B virus; SD: standart desviation; N/A: Not available.

OCI positive group deaths were due to urinary tract cancer, myeloma, and one of sudden death, while in the OCI negative group causes were urinary tract neoplasia, cervix and lung cancer and septicaemia. Therefore, neoplasia was the first cause of death in both groups.

With respect to the outcome of renal transplantation, in terms of graft and patient survival at (9.98 ± 6.41 years) (Figure 1), it was found that OCI patients had significant greater loss of

Table 2: Immunosuppression according to occult HCV infection.

	Occult negative HCV infection (n=129)	Occult positive HCV infection (n=21)	Significance	Odds ratio	95% Confidence interval
Mycophenolate mofetil (n; %)	99; 79.2	18; 85.7	0.767	1,576	0.431-5.761
mTOR (n; %)	22; 17.6	2; 9.5	0.529	0.493	0.107-2.271
ATG (n; %)	42; 49.4	7; 46.7	1	0.896	0.298-2.691
Basiliximab (n; %)	28; 32.9	6; 40	0.572	1,357	0.439-4.192
Calcineurinic inhibitor (n; %)			0.639	N/A	N/A
Tacrolimus	94; 75.2	17; 81			
Cyclosporin	17; 13.6	2; 9.5			
None	14; 11.2	2; 9.5			
Steroids (n; %)	89; 71.8	14; 66.7	0.613	0.787	0.293-2.112

HCV: Hepatitis C virus; mTOR: mammalian Target of Rapamycine; ATG: antilymocyte immunoglobulin; N/A: Not available.

Table 3: Clinical complications post renal transplantation according to negative/positive occult HCV infection.

	Occult negative HCV infection (n=128)	Occult positive HCV infection (n=21)	Significance	Odds ratio	95% Confidence interval
DGF (n; %)	17; 13.5	2; 9.5	1	0.675	0.144-3.161
Acute rejection (n; %)	13; 10.3	2; 9.5	0.603	N/A	N/A
Opportunistic infection (n; %)	46; 36.5	7; 33.3	1	0.870	0.327-2.310
NODAT (n; %)	29; 22.65	6; 28.57	0.384	2,129	0.834-5.433
Cancer (n; %)	24; 18.9	7; 33.3	0.151	2,146	0.781-5.893
Chronic rejection (n; %)	5; 3.9	2; 9.5	0.257	2,589	0.469-14.310
Myocardial infarction (n; %)	14; 11	4; 19	0.289	1,899	0.559-6.449
Cerebrovascular ischemia (n; %)	4; 3.1	1; 4.8	0.540	1,538	0.163-14.467
Graft loss (n; %)	3; 2.4	2; 9.5	0.147	4,351	0.682-27.760
Deaths (n; %)	4; 3.1	3; 14.3	0.06	5,125	1.059-24.796

Acute and chronic rejection had to be confirmed by a renal allograft biopsy. Delayed graft function (DGF) was defined as need of dialysis. New-onset diabetes after transplantation (NODAT) was defined as the requirement of oral antidiabetics or insulin for a minimum period post-KT (often 30 days). Common infections in solid organ transplant recipients as well as infections due to organisms with microbiological resistance were recorded. N/A: Not available.

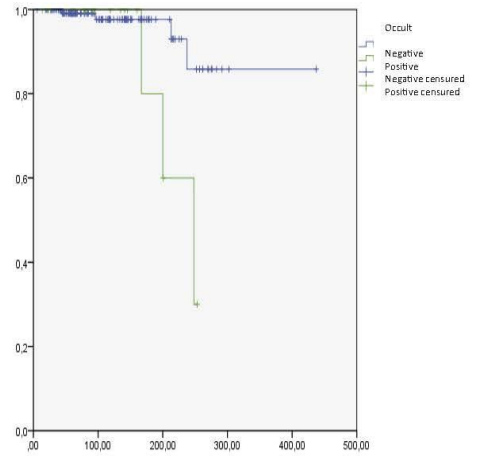


Figure 1A: Kaplan-Meier plot for Graft survival according to OCI recipients (Months). Time to allograft loss was calculated from KT until the date of allograft loss. OCI positive patients had significant greater loss of the graft (2; 9.5%) vs OCI OO negative ones (3; 2.4%), p=0.02.

Figure 1A: Kaplan-Meier plot for Graft survival according to OCI recipients (Months).

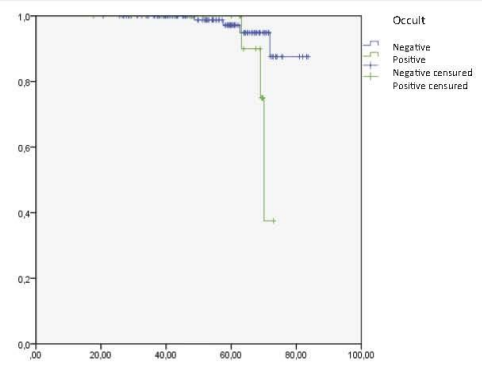


Figure 1B: Kaplan-Meier plot for patient survival according to OCI recipients (Years). The patient's survival was calculated from the KT until the date of death. OCI positive patients had significant less survival (3; 14.3% deaths) than negative ones (4; 3.1%), p=0.04.

Figure 1B: Kaplan-Meier plot for patient survival according to OCI recipients (Years).

the graft (2; 9.5%) (p= 0.02) and patient (3; 14.3%) (p= 0.04,) than negative ones (3; 2.4% vs 4; 3.1%) respectively.

There was a recipient in the OCI negative group with an extremely long-term graft survival (432 months). Statistical analysis was repeated excluding this patient and statistical significances were still confirmed (p=0.02 and p=0.04).

Discussion

The prevalence of positive occult HCV in patients with KT in our study was 14.1%, as evidenced by the detection of HCV RNA in PBMC or plasma after a lower ultracentrifugation than that found in patients on hemodialysis (45%) and IMGN (38%) and more than in patients with diabetic nephropathy (8%) [8,9,13]. The prevalence of HCV infection in KT is quite variable depending on the geographical areas. One study reported a progressive and marked decrease in the prevalence of HCV infection among kidney transplant recipients in Spain from 29.5% in 1990 to 10% in 1998 [15].

Baid and Agrawal [10], found a low prevalence of positive occult HCV infection 2/398 (0.5%) in patients with KT. They performed a 30-month longitudinal follow-up of the 3 patients with occult HCV infection, and there was no clinical or virological evidence of HCV infection. This contrasts with our results in which we observed worse outcome of renal function, perhaps due to a longer follow-up period.

The difference found in the prevalence of occult HCV in both studies can be explained by the difference in prevalence of HCV in the general population in Spain (2%) and in Germany (0.3%).

In the retrospective Spanish epidemiological study (GEHEP) of HCV, which covered the period 2000–2015, the most frequent route of transmission among 10,441 patients for whom data were available was parenteral (58.7%), followed by unknown origin (38, 6%) and sexually transmitted [16]. According to this study, we found that prior blood transfusion was the main risk factor for the acquisition of positive occult HCV. In this sense, occult HCV infection has been described in progress among 50% of the blood donors who tested positive for the HCV core-specific antibody and were negative for anti-HCV and HCV RNA in routine screening in a study of forty two donations (2.1%) [16] (The study was in 2007 blood donors negative for anti HCV and HCV RNA in routine screening, of which 42 were positive for anti-HCV. Three of these 42 donors (7.1%) had occult HCV infection. In another recent study in China that included blood samples from blood donors that were anti-HCV negative and in which it was determined in PBMC, a prevalence of 2.2% was found [17].

The effect of HCV infection on the risk of acute rejection is controversial [7]. It has been reported that the rate of acute rejection in patients with HCV infection is 14.5% over a 20-year period [18]. Immunosuppressive drugs have various effects on viremia. [19–21]. We did not identify statistical differences between both groups in immunosuppression strategies in graft survival or of the patient, and the neoplasm in the positive occult HCV group was related to CKD, and not to immunosuppressive medication [22].

Recipients of organ transplants with an existing active HCV infection have a higher frequency of life-threatening infections after surgery compared to recipients without HCV infection [14,22]. We did not find differences in the two groups according to the result of the occult HCV infection.

In KT, NODAT is an important cause of post-transplant morbidity and mortality [23]. The incidence is quite variable according to its definition, which varies between 2% and 53%. The prevalence of NODAT has increased [24,25]. The cause is multifactorial and infection by HCV has been implicated in the pathogenesis. We did not find differences in the immunosuppression administered between the two groups, but the positive occult HCV infection tended to have more NODAT. KT recipients with HCV have a reduced chance of survival compared to transplant recipients without HCV infection. The mortality rate at HCV positive receptors was approximately 3 times higher than that of non-infected recipients (12; 1% versus 3.7%) [3]. The increased risk of death in renal allograft recipients infected with HCV has been attributed to cardiovascular mortality. We also did not find differences in cardiovascular events (myocardial infarction or cerebrovascular ischemia) and neoplasia was the first cause of death in our study.

In the positive occult HCV group deaths were due to cancer of the urinary tract and myeloma, related to CKD, and in urinary tract neoplasms of occult negative HCV group, cancer of the cervix, related to CKD and lung cancer related to immunodeficiency, according to Stewart et al [22] and septicemia. In our group, the 5-year survival rate of patients is 90% and so, the number of not included dead patients is limited and in no case their cause of death was due to a liver problem.

We did not have any hepatocellular carcinoma. Post-transplant lymphoproliferative disorder and multiple myeloma have been associated with HCV infection [26,27], and we have also found a high prevalence of monoclonal gammopathy in diabetic nephropathy patients with positive occult HCV patients [14]. In a recent meta-analysis by Yuying Li, HCV increased the risk of multiple myeloma in countries with a high prevalence of HCV [28]. It has been also reported by Hashem A. et al a prevalence of 24.5% of OCI in patients diagnosed of multiple myeloma compared to a 3% OCI in a control group ($p=0.01$) suggesting association of OCI and multiple myeloma [29]. Besides, Farahani M. et al have also detected a prevalence of 1.9% of OCI in patients who suffer lymphoproliferative disorders [30].

Limitations of the study

Given the difficulty in recruiting patients for this study, this study can present statistical power problems due to a limited sample size especially when there is stratification. For example, in the comparison between positive and negative OCI and presence of cancer we have a power of 25.5% or a beta error of 74.4%. In another study [10], the prevalence of the occult hepatitis C virus was low, which corroborates the difficulty in recruiting a sufficient sample size. For all these reasons, we believe that the difficulty in obtaining a sufficiently powerful study in this field should be taken into account.

In conclusion, in patients with KT there is a lower prevalence (14.1%) of occult positive HCV compared to the prevalence in patients with immune-mediated glomerulonephritis (39%) or hemodialysis (45%). Blood transfusion prior to KT was the

main risk factor for acquiring occult HCV infection. The long-term survival of the graft and patients of OCI positive receptors were diminished compared to that of OCI negative receptors, although the contribution of particular comorbidities did not reach statistical significance. In the group with positive occult HCV, however, the progression of kidney disease tended to be faster. We did not identify statistical differences between both groups in immunosuppressive strategies and it seems not to affect OCL.

Acknowledgements

ISCIII RETIC REDINREN RD16/0009 FEDER FUNDS

GRANT MUTUA MADRILEÑA.

GRANT FROM GIOVANNI RANDI S.P.A. (Italy)

References

- Pereira BJ, Levey A (1997) Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int* 52: 981-999. [Link: http://bit.ly/2JqYX8U](http://bit.ly/2JqYX8U)
- Ozer Etik D, Ocal S, Boyacioglu AS (2015) Hepatitis C infection in hemodialysis patients: A review. *World J Hepatol* 7: 885-895. [Link: http://bit.ly/2G2uA8e](http://bit.ly/2G2uA8e)
- Kidney Disease (2008) Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, evaluation and treatment of hepatitis C in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 73: S1-S99.
- Morales JM (2012) Impact of Extrahepatic Complications (diabetes and Glomerulonephritis) Associated with Hepatitis C Virus Infection after Renal Transplantation. *Hepatitis C in Renal Disease, Hemodialysis and Transplantation*. *Contrib Nephrol Basel Karger* 176: 108-116. [Link: http://bit.ly/2LcujmM](http://bit.ly/2LcujmM)
- Morales JM (2012) Hepatitis C in Renal Disease, Hemodialysis and Transplantation. *Contrib Nephrol Basel Karger* 176: 97-107. [Link: http://bit.ly/2JrOb40](http://bit.ly/2JrOb40)
- Carreño V (2014) Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications. *J Clin Virol* 61: 315-320. [Link: http://bit.ly/2YHGtVn](http://bit.ly/2YHGtVn)
- Bartolome J, López-Alcorocho, Castillo I (2007) Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis c virus RNA in patients with hepatitis C virus. *J Virol* 81: 7710-7715. [Link: http://bit.ly/2NJVjZF](http://bit.ly/2NJVjZF)
- Barril G, Castillo I, Carreño V (2008) Occult Hepatitis C Virus Infection among Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* 19: 2288-2292. [Link: http://bit.ly/30n7BF8](http://bit.ly/30n7BF8)
- Castillo I, Martínez-Ara JA, Olea T, Bartolome J, Madero R, et al. (2014) High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 86: 619-624. [Link: http://bit.ly/2YKHL4W](http://bit.ly/2YKHL4W)
- Baid-Agrawal S, Schindler R, Reinke P, Staedtler A, Rimpler S, et al. (2014) Prevalence of occult hepatitis C in fection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients. *J Hepatol* 60: 928-933. [Link: http://bit.ly/2Xwa7Dk](http://bit.ly/2Xwa7Dk)
- EBPG Expert Group on Renal Transplantation (2002) European best practice guidelines for renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 17: 50-55. [Link: http://bit.ly/2S3kCtp](http://bit.ly/2S3kCtp)
- Quiroga JA, Avellón A, Bartolomé J, Andréu M, Flores E, et al. (2016) Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion* 56: 1883-1890. [Link: http://bit.ly/32bSTL](http://bit.ly/32bSTL)
- Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positive with PCR. *Nature* 339: 237-238. [Link: http://bit.ly/2XGeZBe](http://bit.ly/2XGeZBe)
- Olea T, Castillo I, González E (2016) Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Diabetic Nephropathy: Epidemiological and Clinical Implications. *WJRR* 3: 65-69. [Link: http://bit.ly/2YEAVYa](http://bit.ly/2YEAVYa)
- Morales JM, Fabrizi F (2015) Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol* 11: 172-182. [Link: http://bit.ly/2XC26wL](http://bit.ly/2XC26wL)
- Aguilera A, D Navarro, F Rodríguez-Frias (2017) Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes of hepatitis C virus genotypes in Spain during 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *J Viral Hepat* 24: 725-732. [Link: http://bit.ly/2NGqlOp](http://bit.ly/2NGqlOp)
- Lin H, Chen X, Zhu S (2016) Prevalence of occult hepatitis C virus infection among blood donors in Jiangsu, China. *Intervirol* 59: 204-210. [Link: http://bit.ly/2Ld3DTp](http://bit.ly/2Ld3DTp)
- Roth D, Gaynor JJ, Reddy KR (2011) Effect of kidney transplantation on outcomes among patients with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol* 22: 1152-1160. [Link: http://bit.ly/32cLzOC](http://bit.ly/32cLzOC)
- Wathashi K (2003) Ciclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38: 1282-1288. [Link: http://bit.ly/2JoPjod](http://bit.ly/2JoPjod)
- Berenguer M, Rayuela A, Zamora J (2007) Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl* 13: 21-29. [Link: http://bit.ly/2G1M44m](http://bit.ly/2G1M44m)
- Oriol M, Baid Agrawal S, Moradpour D (2012) Immunosuppression in Hepatitis C Virus Infected Patients after Kidney Transplantation. *Contrib Nephrol* 176: 97-107. [Link: http://bit.ly/32fgbij](http://bit.ly/32fgbij)
- Stewart JH, Vajdic CM, van Leeuwen MT (2009) The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. *Nephrol Dial Transpl* 24: 3225-3231. [Link: http://bit.ly/32jE1cy](http://bit.ly/32jE1cy)
- Scott DR, Wong JK, Spicer TS, Dent H, Mensah FK, et al. (2010) Adverse impact of hepatitis c virus infection on renal replacement therapy and renal transplant patients in Australia and New Zealand. *Transplantation* 90: 1165-1171. [Link: http://bit.ly/2Lats6x](http://bit.ly/2Lats6x)
- Sneha Palepu, Ramesh Prasad GV (2015) New onset diabetes mellitus after kidney transplantation: Current status and future directions. *World J Diabetes* 6: 445-455. [Link: http://bit.ly/2Xx3aNy](http://bit.ly/2Xx3aNy)
- Muscogiuri G, De Rosa P (2012) New-onset diabetes after kidney transplantation: prevalence, risk factors, and management. *Transplantation* 93: 1189-1195. [Link: http://bit.ly/2Xx4EY8](http://bit.ly/2Xx4EY8)
- Caillard S, Porcher R, Provot F, Moulin B; French PTLD Working Group (2006) Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant* 6: 2735-2742. [Link: http://bit.ly/2G2rhxG](http://bit.ly/2G2rhxG)
- Caillard S, Lamy FX, Quelen C (2006) Myeloma, Hodgkin disease and lymphoid leukaemia after renal transplantation: Characteristics, risk factors and prognosis. *Transplantation* 27: 888-895. [Link: http://bit.ly/2xCw4Bh](http://bit.ly/2xCw4Bh)
- Li Y, Li Y, Zhang L (2017) Hepatitis C virus infection and risk of multiple myeloma: Evidence from a meta-analysis based on 17 case-control studies. *J Viral Hepatol* 24: 1151-1158. [Link: http://bit.ly/2xB7elj](http://bit.ly/2xB7elj)
- Farahani M, Bokharaei-Salim F, Ghane M, Basi A, Meysami P, et al. (2013) Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with lymphoproliferative disorders. *J Med Virol* 85: 235-240. [Link: http://bit.ly/2JKQ4rh](http://bit.ly/2JKQ4rh)
- Hashem A, Fahmy H, Abdo A (2015) Prevalence of Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients with Multiple Myeloma. *Med J Cairo Univ* 83: 507-513. [Link: http://bit.ly/2LixgCX](http://bit.ly/2LixgCX)

Copyright: © 2019 Olea T, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

014

Citation: Olea T, Castillo I, Jiménez C, Díez J, Bartolomé J, et al. (2019) Epidemiological and clinical implications in Kidney Transplantation of occult Hepatitis C virus infection. *Arch Clin Nephrol* 5(1): 009-014. DOI: <http://dx.doi.org/10.17352/acn.000036>



Teresa Olea^{1*}, Inmaculada Castillo², Carlos Jiménez¹, Javier Bartolomé², María José Santana¹, JA Quiroga², Vicente Carreño² and Rafael Selgas¹

¹Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, ICI-PAZ. RED in REN, Madrid, Spain

²Fundación para el Estudio de Hepatitis Virales y Fundación Investigaciones Biomédicas, Madrid, Spain

Received: 30 May, 2019

Accepted: 19 July, 2019

Published: 22 July, 2019

*Corresponding author: Teresa Olea, Department of Nephrology, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046- Madrid, Spain, Tel: +34 658158233; E-mail: teresa.olea@salud.madrid.org

Keywords: Kidney transplantation; Occult hepatitis C virus; Antivirals

<https://www.peertechz.com>



Research Article

Direct action antivirals are effective in the total eradication of HCV in renal transplants

Abstract

Introduction: The main objective of our study was to analyze the effectiveness of antiviral treatment (conventional or with direct-acting antivirals (DAA)) for total eradication of Hepatitis C Virus (HCV) in kidney transplant (KT) recipients. DAA are known drugs that are approved by FDA for clinical and pre-clinical investigations. The efficacy was analyzed by testing for the presence of HCV- ribonucleic acid (RNA) in the pellets obtained after ultracentrifugation of follow-up plasma samples and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with HCV infection who had achieved a sustained virological response (SVR). The safety, and the renal and hepatic repercussions of the antiviral treatment were also evaluated.

Patients and methods: We evaluated 18 adults receiving KT, whose HCV infection had been treated with antiviral therapy. HCV RNA was tested by real-time RT-PCR in PBMC and in 2 ml of plasma after ultracentrifugation.

Results: The predominant HCV genotype was 1b (78.6%), followed by 3a (14.3%) and 2a-2c in 1 patient (7.1%). Of the 18 patients, 13 received treatment post-KT with DAA (8 as first treatment and 5 as retreatment due to relapse). The other 5 patients were responders to INF, INF-RBV and one to DAA pre-KT.

In none of the 14 recipients of KT treated with DAA the presence of HCV RNA was detected neither in PBMC nor in plasma after ultracentrifugation. Viral RNA was also undetectable in the PBMC of the 4 patients with SVR after treatment with IFN (monotherapy or with RBV). However, one of them was positive to HCV RNA in the ultracentrifuged plasma. This patient, male, and diagnosed with HCV genotype 1b, had received INF-PEG monotherapy prior to KT.

During a mean follow-up time of 26.61 ± 6.03 months after antiviral treatment of the patients treated with DAA, we observed a significant increase in protein / creatinine ratio ($P = 0.001$), although there was no impact on the renal function of the graft. Liver function improved significantly as a decrease in AST and ALT ($P = 0.006$ and $P = 0.011$), respectively. The worst evolution of the renal graft of the series was in the recipient with detectable HCV RNA in the ultracentrifuged plasma, due to infection by polyoma virus after a humoral rejection. Liver function despite having SVR, only persisted altered in this patient.

Conclusions: Although a small series of patients are treated and more studies are required, treatment with DAA is effective for complete eradication of the virus unlike conventional treatments with INF, in which HCV can persist being undetectable with conventional techniques. This persistence seems to affect post-KT evolution.

Introduction

Between 1.8 and 8% of patients receiving Kidney Transplantation (KT) are infected with the Hepatitis C virus (HCV) [1]. Despite the higher risk of complications compared to KT recipients without classical HCV, their survival is greater when compared to that of patients on hemodialysis [2]. Conventional antiviral therapies did not eliminate HCV

efficiently and safely. Interferon- α , ribavirin and therapies based on protease inhibitors were the best options [3]. However, interferon α is associated with poor sustained viral response (SVR) (negative viral load after 12 weeks of antiviral treatment termination) (13-43%) and is contraindicated in the post-KT due to the high prevalence of adverse effects (rejection of the renal graft) [4]. Monotherapy with ribavirin was not effective and compared to protease inhibitors, its use was limited in

001

Citation: Olea T, Castillo I, Jiménez C, Bartolomé J, Santana MJ, et al. (2018) Direct action antivirals are effective in the total eradication of HCV in renal transplants. *Ann Antivir Antiretrovir* 3(1): 001-005. DOI: <http://dx.doi.org/10.17352/aaa.000005>

post-KT due to interactions with calcineurin inhibitors and severe adverse effects [5].

The direct-acting antivirals (DAAs) have recently been considered safe for the treatment of HCV in post-TR [6–9]. KT recipients who received at least two different classes of DAA achieved SVR at 12 weeks by 90% [10]. A recent review evaluated the efficacy and safety of treatment with DAA in KT recipients with chronic HCV infection: 98.3% of the patients had a SVR, and liver function improved significantly and, nevertheless, there was no deterioration in renal function [11].

It has been proven in patients with HCV and without renal disease that HCV RNA can remain in the liver and in PBMC after SVR has been obtained both by conventional treatments and by treatment with DAA [12–15]. It has also been shown that the presence of HCV RNA after ultracentrifugation of serum samples in patients with SVR can predict the reactivation of HCV [14]. As KT recipients are immunologically compromised, we wanted to assess the efficacy of conventional antiviral treatments and DAA in those with SVR, testing for HCV RNA in PBMC and in the pellets obtained by ultracentrifugation of plasma samples (the combination of these assays allows the identification of more than 80% of patients with a confirmed occult HCV infection in their liver [15]), as well as to review the safety of the hepatic and renal repercussions of antiviral treatment.

Material and methods

We analyzed 18 renal transplant recipients, older than 18 years, whose HCV infection had been treated with antivirals and had SVR, who came to our Nephrology Department for follow-up. An informed consent was obtained and the study was approved by the Ethics Committee for clinical research. Patients who did not reach SVR or had a reactivation of viremia at the time of the study were excluded. HCV treatment of the 18 recipients of KT is shown in figure 1.

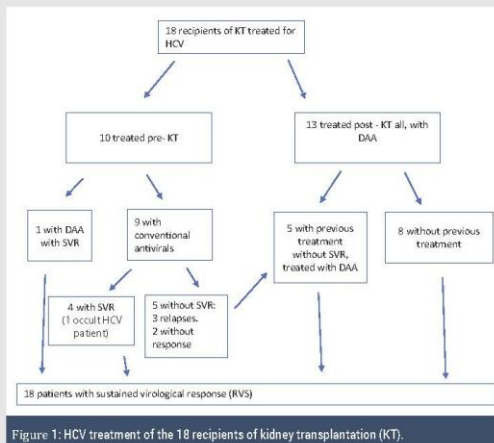


Figure 1: HCV treatment of the 18 recipients of kidney transplantation (KT).

Different parameters were collected in relation to the cause of renal failure, the type of dialysis received, the number of previous transplants, the HCV genotype and the antiviral treatments received, as well as the time of antiviral treatment (dialysis or with functioning KT), whose data are shown in table 1.

In those KT recipients treated post-KT, hepatic and renal function were analyzed before and after treatment with DAA, as well as the number of renal graft rejections, interactions and complications of antiviral treatment.

Methods

Plasma and PBMCs were isolated from anticoagulated blood by density gradient centrifugation (Bicoll, Biochrom, Berlin, Germany). Plasma samples were stored at -30°C and the PBMCs at -30°C in RNAlater solution (Ambion, Austin, TX) until detection of HCV-RNA.

Two milliliters of plasma were ultracentrifuged over a 10% sucrose cushion for 17 h at $100,000 \times g$ and 4°C to concentrate HCV particles [16]. The pellet was dissolved in 250 μl of TE buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM; pH 7.5) and RNA was isolated with the Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). After precipitation, the RNA pellet was dissolved in 10 μl of nucleases-free water. Total RNA was isolated from PBMCs using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). After isopropanol precipitation, RNA pellet was dissolved in 10 μl nucleases-free water and its concentration was measured by spectrophotometry.

Detection of the 5' non-coding region of HCV-RNA was performed by real-time reverse transcription (RT)-PCR with fluorescence resonance energy transfer probes. Two microliters of total RNA isolated from 2 mL of ultracentrifuged plasma, or 0.5 μg of total RNA from PBMCs was retrotranscribed and amplified in a singletube reaction containing RNA reaction mix (LightCycler Master Hybprobe, Roche, and Mannheim, Germany). Primers, probes and conditions of this RT-PCR reaction have been previously reported [17]. For avoiding contaminations, the guidelines of Kwok and Higuchi [18], were strictly observed and negative controls and blanks were coprepared with the samples and accompanied them through the entire PCR process. As positive controls, HCV RNA-positive plasma and PBMCs from patients with chronic HCV infection were used.

Statistics

The categorical variables were compared using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. The continuous variables were calculated using Student's t-test for paired data, and significance using the U-tests of Mann-Whitney and Wilcoxon. All this using the SPSS program version 20.0

Results

The characteristics of the KT patients, treated with DAA, and the treatments used are listed in table 2. The most used regimen was sofosbuvir / ledipasvir and the initial FG in all

Table 1: Clinical data of the 18 patients.

Years (mean ± SD)	55.4 ± 9.09
Male (n; %)	13; 72.2
Renal kidney disease (n; %)	
Glomerular	10; 55.6
Hereditary	4; 22.7
Others	4; 22.7
Type of dialysis (n; %)	
Hemodialysis	10; 55.6
Peritoneal dialysis	2; 11.1
Both	5; 27.7
None	1; 5.6
Genotype HCV (n; %)	
1b	11; 78.6
2a-2c	1; 7.1
3	2; 14.3
N/A	4; 22.7
Moment of the antiviral treatment (n; %)	
Post-kidney transplantation	13; 72.23
Antiviral treatment (n; %)	18; 100
INF o INF-PEG	3; 16.7
INF-RBV	1; 5.6
DAA (first treatment)	9; 50
Second treatments with DAA, due to HCV relapse	5; 27.7
Time from antiviral treatment to analysis occult HCV (months) (mean ± SD)	26.63 ± 6.03
Time from Kidney Transplantation (months) (mean ± SD)	146.66 ± 110.10

Table 2: Characteristics of the 14 patients treated with direct-acting antivirals.

Number Years	Years	Sex	HCV genotype	Immunosuppression	Direct-acting antiviral
1	59	F	1b	CyA + MMF	Sofosbuvir / ledipasvir
2	51	M	1b	Tacro + MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir, previous INF
3	55	M	1b	MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
4	65	F	1b	Tacro + MMF + Pred	Elbasvir / grazoprevir
5	68	M	2a-2c	Tacro + Sirol	Sofosbuvir / ledipasvir, previous INF
6	61	F	1b	Tacro + MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
7	61	F	3a	MMF + CyA	Sofosbuvir / daclastavir
8	44	M	1b	CyA + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
9	46	M	1b	CyA + MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
10	42	M	N/A	MMF	Sofosbuvir / ledipasvir, previous INF
11	56	M	1b	MMF + Tacro	Sofosbuvir / ledipasvir, previous INF without SVR
12	63	M	N/A	Tacro + MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
13	52	M	N/A	Tacro + MMF + Pred	Sofosbuvir / ledipasvir
14	74	M	1b	Tacro + MMF + Pred	Ombitasvir / Paritaprevir / Ritonavir/ Dasabuvir, previous INF without SVR

the recipients were > 30 ml / min. There were no adverse effects during antiviral treatment that required hospitalization or discontinuation of therapy. All patients treated post-KT received the therapy after 6 months post KT, with stable renal function and levels of calcineurin inhibitors and low doses of steroids (in the case of being with these treatments).

In none of the 14 recipients of KT treated with DAA, the presence of HCV RNA was detected neither in PBMC nor in plasma after ultracentrifugation. Viral RNA was also not detected in the PBMCs of the 4 patients with SVR after treatment with INF (monotherapy or with RBV). However, one of them was positive to HCV RNA in the pellet obtained by plasma ultracentrifugation. This patient, male, and diagnosed with HCV genotype 1b, had received INF-PEG monotherapy prior to KT, and during the subsequent follow-up of 103 months the presence of HCV-RNA in serum was not detected by conventional technique. Graft and patient survival were 100% at the end of follow-up.

In the 14 patients treated with DAA, liver function improved significantly when comparing basal and post-treatment levels of AST and ALT (P = 0.006 and P = 0.011, respectively).

Of the patients included in the study, 17 had previously received dialysis (hemodialysis in 55.6%, peritoneal dialysis in 11.1% and both in 27.8%), and the remaining patient was transplanted from a pre-dialysis live donor. 10 patients (55.6%) had their first KT, 7 the second (38.9%) and 1 patient had received his third KT (5.6%). Regarding antiviral treatment, 9 patients were previously treated with KT; 1 with DAA (in which no relapse is targeted), 7 with INF- α , and in one case, with INF- and RBV. Of these, 3 had SVR, another 3 suffered a reactivation after finishing the treatment and 2 did not respond, with the efficacy of pre-KT treatment with conventional antivirals of 50%. The 5 patients who did not respond to pre-KT or relapsed pre-KT were treated post-KT with DAA and another 8 who had not received pre-KT treatment. In total 14 patients were treated with DAA (13 post KT and one pre KT). All patients completed the treatment with DAA and were followed for a minimum of 12 months after antiviral treatment with a mean follow-up time of 26.61 ± 6.03 months.

No significant differences were observed in the renal function of the graft before and after treatment with DAA (in the 13 patients treated after KT). The protein / creatinine index increased significantly after treatment, but was not associated with ledipasvir / sofosbuvir treatment, the genotype, or the underlying type of kidney disease, significantly. The results on liver and kidney function can be found in table 3.

Regarding the evolution of the patient with occult HCV, a nephropathy due to the polyoma virus after the diagnosis and treatment of a humoral rejection, was diagnosed. The kidney function of this patient's graft had not been considered for renal evaluation since it was previously treated with KT with INF-PEG. Its renal function and the evolution of the renal graft was the worst in the serie, despite the fact that he had a follow-up time of 103 months, which was lower than the mean of the serie. Finally, his liver function did not improve significantly, unlike the rest of the patients.

003

Table 3: Hepatic and renal parameters according to pre and post antiviral treatment.

	pre-treatment	post-treatment	p
AST (U/l) (mean ± SD)	44 ± 35.9	18.86 ± 8.7	0.006
ALT (U/l) (mean ± SD)	46.6 ± 45.36	18.86 ± 8.70	0.011
GGT (U/l) (mean ± SD)	54.53 ± 51.91	42.8 ± 58.26	0.422
Total bilirubin (mg/dl) (mean ± SD)	0.64 ± 0.22	0.57 ± 0.24	0.463
Creatinine (mg/dl) (mean ± SD)	1.39 ± 0.29	1.42 ± 0.62	0.278
CKD-EPI (ml/min/1.73 m ²) (mean ± SD)	55.96 ± 16.97	57.53 ± 19.24	0.388
urine protein/creatinine ratio (mg/g) (mean ± SD)	63.25 ± 13.48	327.5 ± 41.50	0.001

Discussion

The main finding in this study is the safety of knowing that occult HCV infection is negative in patients treated with DAA, even if they are kidney transplants and, therefore, immunosuppressed.

Only in a male diagnosed with HCV genotype 1b, treated prior to KT with INF-PEG monotherapy, HCV RNA was detected in the ultracentrifuged plasma. In the 14 KT receptors treated with DAA, HCV RNA was not detected in any case in PBMC or in plasma after ultracentrifugation.

Effectiveness

All patients treated with DAA (1 pre-KT and 13 post-KT) completed the prescribed treatment. 100% of the patients treated with DAA had a SVR, and in no case was HCV RNA detected by RT-PCR in PBMC or in plasma after ultracentrifugation, during a follow-up period of 26.61 ± 6.04 months.

Safety and tolerance of AAD treatment

Liver function improved significantly after treatment with DAA, measured by the detection of AST and ALT, where both decreased after treatment. No significant differences were observed in renal function of the graft before and after treatment with DAA. These findings have also been found in a recent review [11]. However, a worsening of the protein / creatinine index was observed shortly after the therapy, in 4 patients who had received post-KT DAA, (28.5%). The survival of the graft and the patient was 100%, so our data are very similar to those of Lubetzky et al (20). In this series, 31 patients were analyzed, treated with new DAA, post-KT of which 6 presented a worsening of proteinuria (19.3%) and in which there was a tendency to be treated with ledipasvir / sofosbuvir, in comparison with the control group (0.36 ± 0.72 g / g, P = 0.06). Of the 6 patients, in two cases they showed a worsening of renal function [16].

In our series in only one patient, baseline proteinuria was positive and at the end of follow-up in 4 patients it was positive, unlike the work of Lubetzky et al., [19,20], in which no patient developed de novo proteinuria. Among these patients, 1 patient was treated with sirolimus for a lymphoma, and another had been diagnosed with a monoclonal gammopathy of uncertain significance in the past and had a severe von Willebrand disease, so that a renal biopsy could not

be performed to rule out monoclonal gammopathy of renal significance. Neither a renal biopsy was performed in another recipient with new onset proteinuria in a patient with mental retardation, who became intermittent with antiproteinuric drugs. All patients with a positive protein / creatinine index were receiving antiproteinurics and a patient had been biopsied and diagnosed with humoral rejection after receiving antiviral treatment with DAA. In our small series, the increase in protein / creatinine index was not associated with the treatment with ledipasvir / sofosbuvir, the HCV genotype or the type of renal disease, in a significant way. Other studies have also described the appearance of proteinuria in patients treated with DAAs, which include 5 patients with focal and segmental glomerulonephritis development and another case with development of glomerulonephritis mediated by lupus-like immune complexes [19–23].

Podocyte direct damage, immune reconstitution and interaction with concomitant immunosuppressive medication have been suggested as hypotheses [20].

We therefore recommend monitoring urine analysis before, during and after treatment with antiviral drugs, and if proteinuria develops, refer the patient to the nephrologist. Although proteinuria is a marker of kidney damage, its small amount may not represent as much damage.

Regarding our patient with occult HCV infection the persistence of alteration in transaminases reinforces the hypothesis of silent liver damage, since this did not occur in the rest of the patients in the series. However, he did not suffer reactivation of his hepatitis C and neither does this seem to directly affect his post-KT evolution during the observation time.

The detection of the virus by this technique is still a marker of the evolution of the patient and there is a need for more research data that could guide the need or not to receive additional treatments.

In conclusion, although a small series of patients is treated, and more studies are required, treatment with DAA is effective with complete eradication of the virus, unlike conventional treatments, with INF, in which HCV can persist, being undetectable with conventional techniques and this persistence seems to affect post-KT evolution.

References

1. Scott DR, Wong JK, Spicer TS, Dent H, Mensah FK (2010) Adverse impact of hepatitis c virus infection in renal replacement therapy and renal transplantation in patients in Australia and New Zealand. *Transplantation* 90: 1165-1171. [Link: https://bit.ly/2SuVwCz](https://bit.ly/2SuVwCz)
2. Ingsathit A, Kamanamool N, Thakkinstian A, Sumethkul V (2013) Survival advantage of kidney transplantation over dialysis in patients with hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *Transplantation* 95: 943-948. [Link: https://bit.ly/2M3Oza7](https://bit.ly/2M3Oza7)
3. Fabrizi F, Dixit V, Martin P, Lunghi G (2006) Meta-analysis: anti-viral therapy of hepatitis C virus-related liver disease in renal transplant patients. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 1413-1422. [Link: https://bit.ly/2JPqQHW](https://bit.ly/2JPqQHW)
4. Berenguer M (2008) Systematic review of the treatment of established

- recurrent hepatitis C with pegylated interferon in combination with ribavirin. *J Hepatol* 49: 274-287. [Link: https://bit.ly/2JUlP9D](https://bit.ly/2JUlP9D)
5. Nair SP (2013) Protease inhibitor therapy post-liver transplantation in the treatment of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Hepatol* 9: 388-390. [Link: https://bit.ly/2M30L9I](https://bit.ly/2M30L9I)
 6. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Tarek Hassanein (2014) Daclastavir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 370: 211-221. [Link: https://bit.ly/2JUAA3J](https://bit.ly/2JUAA3J)
 7. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, et al. (2014) Simeprevir plus sofosbuvir with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responder to pegylated interferon and ribavirin and treatment naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 384: 1756-1765. [Link: https://bit.ly/2Y73DGD](https://bit.ly/2Y73DGD)
 8. Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, et al. (2014) Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 370: 1879-1893. [Link: https://bit.ly/2YaWffx](https://bit.ly/2YaWffx)
 9. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Paul Kwo, Mario Chojkier, et al. (2014) Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 370: 1483-1493. [Link: https://bit.ly/2Y6kFED](https://bit.ly/2Y6kFED)
 10. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T (2013) Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 368: 1878-1887. [Link: https://bit.ly/32FignS](https://bit.ly/32FignS)
 11. Keliang Chen BD, Pei Lu, Reijin Song, Zhang J, Tao R, et al. (2017) Direct-acting antiviral agent efficacy and safety in renal transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *Medicine* 96: 30. [Link: https://bit.ly/2XUHLHm](https://bit.ly/2XUHLHm)
 12. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Jablonska J, Colby TV, et al. (2006) Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 41: 106-114. [Link: https://bit.ly/2y0Mh3p](https://bit.ly/2y0Mh3p)
 13. Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, López-Alcorocho JM, Pardo M, Bartolomé J, et al. (2006) Hepatitis C virus replicates in the liver of sustained responder patients to antiviral treatment. *Clin Infect Dis* 43: 1277-1283. [Link: https://bit.ly/2Z3aDVX](https://bit.ly/2Z3aDVX)
 14. Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, BARRIL G, CARREÑO V (2009) Presence of HCV -RNA after ultracentrifugation of serum samples during the follow-up of chronic hepatitis C patients with a sustained virological response may predict reactivation of hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 30: 477-486. [Link: https://bit.ly/2GqUzq2](https://bit.ly/2GqUzq2)
 15. Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V (2010) Diagnosis of occult hepatitis C virus without the need of or liver biopsy. *J Med Virol* 82: 1554-1559. [Link: https://bit.ly/209gok8](https://bit.ly/209gok8)
 16. Elmasry S, Wadhwa S, Bang BR, Cook L, Chopra S, et al. (2017) Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent infection after liver transplantation. *Gastroenterology* 152: 550-553. [Link: https://bit.ly/2Lyf530](https://bit.ly/2Lyf530)
 17. Bartolomé J, López-Alcorocho, Castillo I, Elena Rodríguez-Iñigo, Juan Antonio Quiroga (2007) Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with hepatitis C virus. *J Virol* 81: 7710-7715. [Link: https://bit.ly/2Su73BN](https://bit.ly/2Su73BN)
 18. Quiroga JA, Avellón A, Bartolomé J, Andréu M, Flores E, et al. (2016) Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion* 56: 1883-1890. [Link: https://bit.ly/2Z8puyA](https://bit.ly/2Z8puyA)
 19. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positive with PCR. *Nature* 339: 237-238. [Link: https://bit.ly/2YcYG35](https://bit.ly/2YcYG35)
 20. Lubetzky M, Chun S, Joelson A, Coco M, Kamal L, et al. (2017) Safety and efficacy of treatment of hepatitis C in kidney transplant recipients with direct acting antiviral agents. *Transplantation* 101: 1704-1710. [Link: https://bit.ly/2LCC0u0](https://bit.ly/2LCC0u0)
 21. Hogan JJ, Lim MA, Palmer MB, Bloom RD, Chung RT, et al. (2017) Development of Proteinuria and Focal Segmental Glomerulosclerosis During Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 16: 658-660. [Link: https://bit.ly/2Ze05DT](https://bit.ly/2Ze05DT)
 22. Lin MV, Sise ME, Pavlakis M, Amundsen BM, Chute D (2016) Efficacy and safety of direct acting antivirals in kidney transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* 11: e0158431. [Link: https://bit.ly/2Z6evpl](https://bit.ly/2Z6evpl)
 23. Sise ME, Wisocky J, Rosales IA, Chute D, Holmes JA, et al. (2016) Lupus-like immune complex-mediated glomerulonephritis in patients with hepatitis C virus infection treated with oral, interferon-free, direct-acting antiviral therapy. *Kidney Int Rep* 1: 135-143. [Link: https://bit.ly/208iDnK](https://bit.ly/208iDnK)

Discover a bigger Impact and Visibility of your article publication with Peertechz Publications

Highlights

- ✦ Signatory publisher of ORCID
- ✦ Signatory Publisher of DORA (San Francisco Declaration on Research Assessment)
- ✦ Articles archived in world's renowned service providers such as Portico, CNKI, AGRIS, TDNet, Base (Bielefeld University Library), CrossRef, Scilit, J-Gate etc.
- ✦ Journals indexed in ICMEJ, SHERPA/SDMED, Google Scholar etc.
- ✦ OAI-PMH (Open Archives Initiative Protocol for Metadata Harvesting)
- ✦ Dedicated Editorial Board for every journal
- ✦ Accurate and rapid peer-review process
- ✦ Increased citations of published articles through promotions
- ✦ Reduced timeline for article publication

Submit your articles and experience a new surge in publication services (<https://www.peertechz.com/submission>).

Peertechz journals wishes everlasting success in your every endeavours.

Copyright: © 2019 Olea T, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

005

Citation: Olea T, Castillo I, Jiménez C, Bartolomé J, Santana MJ, et al. (2018) Direct action antivirals are effective in the total eradication of HCV in renal transplants. *Ann Antivir Antiretrovir* 3(1): 001-005. DOI: <http://dx.doi.org/10.17352/aaa.000005>

INTRODUCCIÓN GENERAL A LA TESIS DOCTORAL

Este trabajo reúne cuatro estudios independientes distribuidos en cuatro capítulos diferentes. En conjunto del trabajo nos introduce en el estudio epidemiológico de la infección oculta por el VHC en una población de pacientes con enfermedad renal crónica centrándose en tres grupos según su diagnóstico (glomerulopatías, ND) y un tercer grupo de trasplantados renales. En cada grupo además de establecer la prevalencia y posibles formas de transmisión del VHC, trata de determinar las implicaciones clínicas que la infección oculta por el VHC pueda tener. Incluimos un cuarto grupo de pacientes VHC positivos tratados con antivirales que alcanzaron la RVS en los que quisimos comprobar la eficacia, seguridad y repercusión clínica (hepática y renal), del tratamiento antiviral. Dado que el mayor número de pacientes tratados en nuestro servicio se encontraba dentro del grupo de trasplantados renales, lo decidimos realizar en este grupo, dada la baja prevalencia de anti VHC positivos tratados, en enfermos con nefropatías glomerulares o diabética.

La Tesis Doctoral se inicia con una introducción general que ofrece una perspectiva global de los aspectos más relevantes que abarca el estudio y las controversias vigentes en torno al VHC. Posteriormente, se describen la justificación, hipótesis, objetivos y metodología del estudio. A continuación, se presentan los cuatro estudios de investigación; los tres primeros de carácter prospectivo, y el último retrospectivo. Finalmente, se realizan una discusión y conclusiones generales.