

Seroprevalencia y detección del genoma del Virus de la Hepatitis E en individuos que conviven con el VIH y que hacen parte del programa de atención integral a pacientes en una IPS de la ciudad de Medellín.

Leidy Maritza Sánchez González
Grupo Microbiología Ambiental, Universidad de Antioquia

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS EN VIROLOGÍA

TUTORA
Astrid Milena Bedoya, MSc, DSci
Coordinadora grupo de Microbiología Ambiental, Universidad de Antioquia

COTUTORA
Ana Lucía Rodríguez Perea, MSc, DSci
Grupo Inmunovirología, Universidad de Antioquia

COMITÉ TUTORIAL
Carolina Montoya Ruiz, MSc, DSci
Liliana Yazmín Acevedo Sáenz, MSc, DSci
Armando Baena Zapata, PhD

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN
2022

CONTENIDO

1. Título

1.1. Autor

2. Resumen

3. Introducción

3.1. Antecedentes

3.2. Marco teórico

3.2.1. Descripción del virus de la Hepatitis E

3.2.2. Replicación del virus de la Hepatitis E

3.2.3. Epidemiología de la infección

3.2.4. Patogénesis de la infección

3.2.5. Coinfección VHE/VIH

3.3. Planteamiento del problema

4. Objetivo general y específicos, Hipótesis y Pregunta de investigación

4.1. Objetivo general

4.2. Objetivos específicos

4.3. Hipótesis

4.4. Pregunta de investigación

5. Metodología aplicada

5.1. Diseño del estudio y muestra

5.2. Criterios de elegibilidad

5.3. Consideraciones éticas

5.4. Detección de anticuerpos anti-VHE

- 5.4.1. Detección de anticuerpos IgM
- 5.4.2. Detección de anticuerpos IgG
- 5.5. Extracción de ARN
- 5.6. Detección del VHE por RT-PCR *in house*
- 5.7. Análisis estadístico

6. Resultados

- 6.1. Descripción de las variables socioeconómicas, sociodemográficas, hábitos y estado de salud de los participantes del estudio.
- 6.2. Frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgM anti-VHE y variables socioeconómicas, sociodemográficas, hábitos y estado de salud de estos individuos.
- 6.3. Frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgG anti-VHE y variables socioeconómicas, sociodemográficas, hábitos y estado de salud de estos individuos.
- 6.4. Análisis de asociación entre las variables sociodemográficas, socioeconómicas, clínicas y la frecuencia de individuos con anticuerpos IgG anti-VHE
- 6.5. Estandarización de la RT-PCR multiplex para la detección del VHE y la RNAsa P.
- 6.6. Detección del ARN del VHE utilizando la técnica RT-PCR con primers dirigidos al ORF3.

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Perspectivas

10. Agradecimientos

11. Bibliografía

12. Anexos

- 12.1.** Consentimiento informado
- 12.2.** Encuesta
- 12.3.** Acta de aprobación por el comité de ética

Abreviaturas

Ac: anticuerpo

ADNc: ADN complementario

ALT: alanina aminotransferasa

ARN: ácido ribonucleico

AST: aspartato aminotransferasa

CIB: corporación para investigaciones biológicas

CDC: centro para el control y prevención de enfermedades

CTLA-4: antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico

CT: cycle threshold

Δ CT: delta ct

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ESCRT-I: complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte

GGT: gamma-glutamyl transferasa

HSPG: proteoglicanos heparán sulfato

OMS: organización mundial de la salud

OR: odds ratio

ORF: reading frame

PD-1: ligando 1 de muerte programada

PCR: polymerase chain reaction

PRRs: pattern-recognition receptors

R²: coeficiente de determinación

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad

TSG101: gen 101 de susceptibilidad tumoral

URF: unidades relativas de fluorescencia

VHA: virus de la hepatitis A

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VHE: virus de la hepatitis E

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Índice de figuras

Figura 1. Genoma del VHE.....	27
Figura 2. Ciclo de replicación del VHE.....	29
Figura 3. Diagrama de flujo del diagnóstico serológico y molecular de los individuos del estudio.....	57
Figura 4. Resultados representativos de la dilución seriada de cDNA del VHE...	74
Figura 5. Curvas de detección en reacciones monoplex y multiplex.....	75
Figura 6. Curvas de amplificación para las muestras positivas por RT-PCR para la detección del ARN del VHE y de la RNAsa P.....	77

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del VIH de acuerdo al CDC en relación a las categorías clínicas e inmunológicas	38
Tabla 2. Seroprevalencia del VHE en individuos que conviven con el VIH en países de varias regiones del mundo.....	42
Tabla 3. Variables socioeconómicas, sociodemográficas y hábitos de los individuos que participaron en el estudio.....	59
Tabla 4. Variables clínicas de los individuos que participaron en el estudio.....	61

Tabla 5. Variables socioeconómicas, sociodemográficas y hábitos de los individuos positivos para anticuerpos IgM anti-VHE.....	63
Tabla 6. Variables clínicas de los individuos con anticuerpos IgM anti-VHE.....	64
Tabla 7. Resultados del análisis bivariado con la prueba exacta de Fisher	67
Tabla 8. Resultados del análisis de asociación multivariado (cálculo de OR).	70
Tabla 9. Valores de Ct y delta (Δ) ct en reacciones multiplex y monoplex para la RNAsa P y el ORF3 del VHE	76
Tabla 10. Variables socioeconómicas, sociodemográficas, hábitos y clínicas de los individuos positivos para la amplificación del ORF3 del VHE	79

1. Título

Seroprevalencia y detección del genoma del Virus de la Hepatitis E en individuos que conviven con el VIH y que hacen parte del programa de atención en una IPS de la ciudad de Medellín.

1.1. Autora

Leidy Maritza Sánchez González. Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología. Grupo de Microbiología Ambiental, Medellín, Colombia.

2. Resumen

Introducción: el Virus de la Hepatitis E (VHE) es un virus hepatotropo de transmisión entérica. En individuos inmunocompetentes usualmente esta infección tiene un curso agudo y autolimitado; sin embargo, en individuos que conviven con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) la infección puede ser grave y de evolución crónica, caracterizada por la presencia de ARN viral por más de 6 meses y títulos bajos o moderados de anticuerpos IgG e IgM, especialmente en individuos con un recuento de células T CD4⁺ menor a 250 células/mm³. En Colombia, la infección por el VHE no es de notificación obligatoria, ni se hace un diagnóstico de rutina; y se ha demostrado la circulación del virus en individuos con diagnóstico de otras hepatitis virales, porcicultores, cerdos y aguas residuales, y presencia del genotipo 3 del VHE en individuos con hepatitis y en aguas residuales. Debido al desconocimiento de la infección por VHE en individuos VIH positivos y al riesgo elevado de infección crónica y otras complicaciones, es necesario realizar estudios que permitan determinar la circulación del virus e identificar factores de riesgo

asociados; para implementar acciones encaminadas al control de la transmisión, tratamiento y prevención de complicaciones asociadas a la infección. **Objetivo:** determinar la seroprevalencia e infección por el VHE y describir los factores de riesgo asociados a la infección en individuos que conviven con el VIH. **Metodología:** de una cohorte de 1566 individuos que conviven con el VIH que consultaron al programa de atención integral a pacientes en una IPS de la ciudad de Medellín, se reclutaron 133 individuos mayores de 18 años entre octubre del 2019 y enero del 2020. Utilizando una encuesta estructurada se indagaron datos demográficos, socioeconómicos y factores de riesgo asociados a la infección por el VHE. Adicionalmente, se obtuvieron datos clínicos y paraclínicos de las historias médicas de los participantes. El comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia aprobó el protocolo del estudio y el consentimiento informado empleado. De cada individuo se obtuvo una muestra de suero para la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos contra VHE usando una prueba de ELISA comercial (DIAPRO). A partir del suero de los pacientes se obtuvo ARN, y a través de una RT-PCR *in house* multiplex se amplificó el ORF3 del genoma del virus y una secuencia de la RNasa P como control interno de la prueba. **Análisis estadísticos:** para las variables categóricas se describieron frecuencias absolutas y relativas, y para las variables numéricas se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión, a éstas se les evaluó la normalidad utilizando la prueba de Shapiro Wilk. En el análisis bivariado entre los factores de riesgo y la presencia de anticuerpos se utilizó la prueba exacta de Fisher y en el análisis de asociación se calcularon Odds ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% (IC95%). Para todas las pruebas un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados: El 70,7% (94/133) de los individuos incluidos en el estudio eran hombres y el 56,4% (75/133) tenían entre 20-49 años. El 92,5% (123/133) de la población residía en zona urbana, el 91,7% (122/133) contaban con sistema de acueducto y el 89,5% (119/133) tenían red de saneamiento. Por último, en relación con la clasificación clínica de la infección por VIH que tenían los individuos al momento de ingresar al programa de atención integral, se encontró que el 54,9% (73/133) estaban en el estadio C1-C3, el 34,6% (46/133) en el estadio A1-A3 y el 10,5% (14/133) en los estadios B1-B3.

Se detectaron anticuerpos IgG e IgM específicos contra el VHE en el 15% (20/133) y el 5,3% (7/133) de los individuos VIH positivos, respectivamente. El 75% (15/20) de los individuos con anticuerpos IgG anti-VHE eran hombres y 55% (11/20) tenían entre 20-49 años, en su mayoría residían en zona urbana [90% (18/20)], contaban con sistema de acueducto y tenían red de saneamiento [80% (16/20)]. La mitad de esta población tenía recuentos de células T CD4⁺ >500 células/mm³ [50% (10/20)], mientras que solo el 10% de los individuos tenían recuentos <200 células/mm³. El 90% (18/20) tenían una carga viral para VIH indetectable y el 95% (19/20) tenían pruebas de función hepáticas dentro del rango de referencia.

De los individuos con anticuerpos IgM anti-VHE, la mayoría eran hombres [71%(5/7)] y el [57,1%(4/7)] tenía entre 20-49 años. Todos los individuos con anticuerpos IgM residían en zona urbana y contaban con red de saneamiento; tenían carga viral indetectable, el 48% (5/7) tenía recuentos de células T CD4⁺ >500 células/mm³ y ninguno de estos individuos presentó recuentos menores a 200 células/mm³.

En los análisis de regresión logística encontramos que los individuos sin alcantarillado tenían mayor probabilidad de tener anticuerpos IgG contra el VHE [OR: 128 (IC 95%: 3,1-5358,6)]. De igual manera se encontró que los individuos con un estadio clínico C1-C3 tenían una menor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE [OR: 0,032 (IC 95%: 0,001-0,862)].

El ARN del VHE, se detectó en el 2,3% (3/128) de los individuos incluidos en el estudio. Cinco individuos fueron excluidos de los análisis debido a que no se obtuvo amplificación del gen de la RNAsa P. De los individuos positivos para el ARN viral, dos fueron negativos para anticuerpos IgG e IgM anti-VHE y uno fue positivo para ambos anticuerpos. Adicionalmente, dos de los individuos eran hombres y una era mujer, con edades de 47, 54 y 60 años, respectivamente. Los tres individuos siempre han residido en el área urbana de Medellín y contaban con servicios de acueducto y red de saneamiento; además tuvieron recuentos de células T CD4⁺ >500 células/mm³, tenían pruebas de función hepáticas con valores dentro del rango de referencia, carga viral indetectable, vacuna contra la Hepatitis B y no tenían historial de infección por otras hepatitis virales. **Conclusiones:** se obtuvo una frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgG anti-VHE del 15%, resultados consistentes con lo reportado en América (4,1%-19%). En los análisis de asociación se encontró que los individuos en el estadio C1-C3 tienen una menor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE. Adicionalmente, se encontró que los individuos que no contaban con red de saneamiento tenían una mayor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE, factor de riesgo que ha sido descrito para la transmisión del virus.

Summary

Introduction: Hepatitis E Virus (HEV) is an enterically transmitted hepatotropic. In immunocompetent individuals, this infection usually has an acute and self-limited course; however, in individuals living with Human Immunodeficiency Virus (HIV), the infection can be severe and of chronic evolution, characterized by the presence of viral RNA for more than 6 months and low or moderate titers of IgG and IgM antibodies, especially in those with a TCD4+ cell count of less than 250/mm³. In Colombia, HEV infection is not notifiable; However, there is evidence that demonstrates the circulation of the virus in individuals diagnosed with other viral hepatitis, pig farmers, pigs, and wastewater, and the presence of HEV genotype 3 in individuals with hepatitis and in wastewater. Due to the lack of knowledge of HEV infection in HIV-positive individuals and the high risk of chronic infection and other complications, it is necessary to carry out studies to determine the circulation of the virus and identify associated risk factors to implement actions aiming at controlling transmission, treatment and prevention of complications associated with infection.

Objective: To determine the seroprevalence and infection by HEV and to describe the risk factors associated with HEV infection in individuals living with HIV.

Methodology: from a cohort of 1,566 individuals living with HIV who consulted the comprehensive patient care program at an IPS in the city of Medellin, 133 individuals over 18 years of age were recruited between October 2019 and January 2020. Using a structured survey, demographic, socioeconomic data and risk factors associated with HEV infection were investigated. Additionally, clinical and paraclinical data were obtained from medical records of the participants. The Bioethics Committee of the University Research Headquarters of the University of Antioquia approved the study

protocol and the informed consent used. A serum sample was obtained from each individual for the detection of HEV-specific IgG and IgM antibodies using a commercial ELISA test (DIAPRO). RNA was obtained from the serum of the patients, and through an in-house multiplex RT-PCR, the ORF3 of the virus genome and an RNase P sequence were amplified as internal control of the test. **Statistical analysis:** Absolute and relative frequencies were described for categorical variables, and measures of central tendency and dispersion were used for numerical variables, and normality was assessed using the Shapiro Wilk test. In the bivariate analysis between the risk factors and the presence of antibodies, Fisher's exact test was used, and in the association analysis, the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (95% CI) were calculated. For all tests a p value <0.05 value was considered statistically significant. **Results:** 70.7% (94/133) of the individuals included in the study were men and 56.4% (75/133) were between 20-49 years old. 92.5% (123/133) of the population lived in urban areas, 91.7% (122/133) had an aqueduct system and 89.5% (119/133) had a sanitation network. Finally, in relation to the clinical classification of HIV infection that individuals had at the time of entering the comprehensive care program, it was found that 54.9% (73/133) were in stage C1-C3, the 34.6% (46/133) in stage A1-A3 and 10.5% (14/133) in stages B1-B3. Additionally, specific IgG and IgM antibodies against HEV were detected in 15% (20/133) and 5.3% (7/133) of HIV-positive individuals, respectively. 75% (15/20) of the individuals with anti-HEV IgG antibodies were men and 55% (11/20) were between 20-49 years old, mostly residing in urban areas [90% (18/20)], had an aqueduct system and had a sanitation network [80% (16/20)]. Half of this population had CD4+ T cell counts >500 cells/mm³ [50% (10/10)], whereas only 10% of

individuals had counts <200 cells/mm³. 90% (18/20) had undetectable HIV viral load and 95% (19/20) had liver function tests within the reference range.

Of the individuals with IgM anti-HEV antibodies, the majority were men 71% (5/7) and 57.1% (4/7) were between 20-49 years old. All individuals with IgM antibodies lived in urban areas and had a sanitation network; had undetectable viral load, 48% (5/7) had TCD4+ cell counts >500 cells/mm³, and none of these individuals had counts less than 200 cells/mm³.

In logistic regression analyses, we found that individuals without sewerage were more likely to have IgG antibodies against HEV [OR: 128 (95% CI: 3.1-5358.6)]. Similarly, it was found that individuals with a clinical stage C1-C3 had a lower probability of having anti-HEV IgG antibodies [OR: 0.032 (95% CI: 0.001-0.862)].

HEV RNA was detected in 2.3% (3/128) of the individuals included in the study. Five individuals were excluded from the analyzes because no amplification of the RNase P gene was obtained. Of the individuals positive for viral RNA, two were negative for IgG and IgM anti-HEV antibodies and one was positive for both antibodies. Additionally, two of the individuals were men and one was a woman, with ages of 47, 54 and 60 years, respectively. The three individuals have always lived in the urban area of Medellin and had access to aqueduct and sanitation services; they also had CD4+ T-cell counts >500 cells/mm³, liver function tests within the reference range, undetectable viral load, Hepatitis B vaccination, and no history of infection with other viral hepatitis.

Conclusions: 15% of individuals living with HIV had anti-HEV IgG antibodies which is consistent with results reported in America (4.1%-19%). In the association analyzes it was found that individuals in stage C1-C3 they are less likely to have

anti-HEV IgG antibodies. Additionally, it was found that individuals who did not have a sanitation network were more likely to have IgG anti-HEV antibodies, a risk factor that has been described for virus transmission.

3. Introducción

3.1 Antecedentes

Las hepatitis virales son de gran importancia en salud pública. Se estima que cada año mueren 1,4 millones de personas por infección aguda o por causas relacionadas con la infección como cáncer de hígado y cirrosis. A la fecha se han reconocido 5 agentes causales de hepatitis virales: A, B, C, D y E, los cuales difieren en su epidemiología, vías de transmisión y manifestaciones clínicas. El 47% de las muertes son atribuidas al virus de la Hepatitis B (VHB), 48% al virus de la Hepatitis C (VHC) y el 5% restante al virus de la Hepatitis A (VHA) y al virus de la Hepatitis E (VHE)¹. El virus de la hepatitis D (VHD) solo ocurre en personas que ya estén infectadas por el VHB, individuos que a menudo desarrollan una hepatitis aguda fulminante caracterizada por una respuesta inflamatoria exacerbada sistémica, que, por lo general, progresa rápidamente a cirrosis y al desarrollo de fibrosis, con falla de uno o varios órganos².

Los virus hepatotropos de transmisión entérica son el VHA y el VHE, los cuales ingresan al huésped por la ingestión de agua o alimentos contaminados, causando infecciones esporádicas o epidemias a nivel mundial. El VHA es altamente prevalente en adultos y niños de países de bajos ingresos, sin embargo, en los últimos años se ha observado una tendencia a la disminución de su frecuencia debido al mejoramiento de las condiciones de saneamiento de la población³. Por otro lado, la infección por el VHE que se presentaba principalmente en países en vía de desarrollo ahora se reporta como una de las causas más comunes de infección por hepatitis entérica en todo el mundo y actualmente la infección

autóctona por este virus es considerada una enfermedad emergente en toda Europa⁴.

Se estima que aproximadamente una tercera parte de la población mundial ha estado infectada por VHE, especialmente en países de África, Asia y Medio Oriente⁵. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año ocurren 20 millones de casos de hepatitis E en el mundo, de estos, 3,3 millones presentan los síntomas clínicos de la enfermedad (enfermedad aguda)^{5,6}. De los 8 genotipos identificados del VHE, los genotipos VHE1, VHE2, VHE3, VHE4, y VHE7 producen infección en humanos y difieren en sus patrones epidemiológicos, definidos por la distribución, rutas de transmisión, prevalencia y las características clínicas presentadas en el hospedero⁷. Para los genotipos VHE1 y VHE2 la principal vía de transmisión es la fecal-oral, el virus se excreta en las heces de los individuos infectados contaminando los alimentos y el agua y generando brotes. Los genotipos VHE1 y VHE2 son más frecuentes en países en desarrollo y generalmente están asociados con condiciones higiénico-sanitarias deficientes, presentándose un patrón epidemiológico hiperendémico y endémico en regiones de Asia, África, medio oriente y en algunos países de América Latina como Uruguay, Venezuela, México y Cuba⁸. Por el contrario, los genotipos VHE3 y VHE4 son principalmente de origen zoonótico, y se transmiten por el contacto estrecho con animales infectados (principalmente el cerdo), o por la ingestión de productos cárnicos de estos animales. Se presentan generalmente como infecciones esporádicas o no endémicas en países de Europa occidental, Japón, Australia, Estados Unidos y países de América Latina como Argentina, Brasil, Bolivia, Venezuela, Cuba, México,

Uruguay, Chile y Costa Rica⁸; además, estos genotipos se han asociado con infección crónica en individuos inmunocomprometidos, así como el genotipo VHE7^{9,10,11,12}.

Por los pocos estudios realizados en América Latina, esta región era considerada no endémica para VHE. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento en los estudios de seroprevalencia, que a través de ensayos inmunoenzimáticos detectan anticuerpos IgM e IgG anti-VHE, que han permitido detectar seroprevalencias más altas a lo que se había demostrado previamente. Los estudios revelan una prevalencia de anticuerpos IgG anti-VHE del 4,4% en Argentina¹³, 34,8% en Bolivia¹⁴ y 36% en poblaciones rurales de México¹⁵.

En Colombia la información se limita a algunos grupos poblacionales. Un estudio realizado por Duque y colaboradores en donantes de sangre del municipio de Yarumal Antioquia encontró una seroprevalencia del 45,2%, lo que sugiere exposición al virus, probablemente atribuida a la porcicultura y a la falta de acceso al agua potable, la cual solo fue disponible desde el 2007¹⁶. En el 2014, Peláez y colaboradores encontraron que 8,7% de los sueros de pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral provenientes de diferentes regiones del país tenían anticuerpos anti-VHE¹⁷. En 2016, Peláez y colaboradores evaluaron 1097 sueros y encontraron que el 25,3% eran positivos para anticuerpos IgG anti-VHE, 5,7% para IgM anti-VHE y 5,8% eran positivos para ambos anticuerpos. De los individuos con infección simultánea del VHE/VHA, encontraron que el 33,6% y 16,1% tenían anticuerpos IgG e IgM anti-HEV, respectivamente. De los individuos con infección simultánea del VHE/VHB, el 23,4% y el 8,1% tenían anticuerpos IgG e IgM anti-

VHE, respectivamente, y de los individuos con infección simultánea VHE/VHC, el 35,4% y 5,8% de los individuos infectados tenían anticuerpos IgG e IgM anti-VHE, respectivamente. En este mismo estudio a las 64 muestras positivas (5,8%) para ambos anticuerpos, se le realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), encontrándose que 52 tenían el genoma del VHE y de éstas, nueve secuencias se agruparon como genotipo VHE3a de origen porcino (cepa norteamericana)¹⁸.

Adicionalmente, se ha evaluado la presencia de anticuerpos en la población expuesta a porcinos, particularmente en trabajadores de fincas porcícolas, encontrándose que un 11,2% de los individuos tenían anticuerpos IgG anti-VHE¹⁹, y 15,4% presentaban anticuerpos totales anti-VHE²⁰.

En individuos inmunocompetentes, la infección por VHE generalmente se presenta como una enfermedad autolimitada con resolución rápida; que es indistinguible al de otras hepatitis virales, mientras que en individuos inmunosuprimidos como trasplantados, pacientes con alteraciones hematológicas y pacientes que conviven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), principalmente aquellos con recuentos de células T CD4⁺ <200 o 250 células/mm³ pueden presentar un cuadro de hepatitis crónica que posteriormente puede evolucionar hacia una hepatitis fulminante o cirrosis. La infección crónica se caracteriza por la presencia de ARN en suero y/o heces durante 3 a 6 meses⁹, acompañado de niveles ligeramente elevados o moderados de transaminasas séricas principalmente de alanina aminotransferasa (ALT), títulos bajos o moderados de anticuerpos IgG e IgM que pueden persistir durante años²¹, además, la infección puede ser asintomática. Sin embargo, en algunos grupos poblacionales como los individuos inmunosuprimidos

puede evolucionar hacia una cirrosis e inflamación activa²² con síntomas como dolor abdominal, ictericia y fatiga²³. Se ha reportado con mayor frecuencia manifestaciones extrahepáticas durante la infección crónica por el VHE, especialmente síndromes neurológicos como amiotrofia neurálgica, síndrome de Guillain-Barré, neuritis braquial bilateral, neuropatía periférica, encefalitis, pancreatitis, deterioro en la función renal y trombocitopenia, asociados a la infección por los genotipos VHE1 y VHE3²³⁻²⁵.

Aún es controversial si los individuos que conviven con el VIH tienen un mayor riesgo de adquirir la infección por VHE comparado con la población general, lo cual es reflejado en las variaciones de la seroprevalencia a nivel mundial. En Ghana, se reportó una seroprevalencia de IgG anti-VHE del 45,3% en estos individuos; sin embargo, en este estudio no se encontró asociación estadísticamente significativa con los recuentos de células T CD4⁺ <200 células/mm³ y la presencia de anticuerpos anti-VHE; tampoco se detectó el ARN del VHE²⁶. Un estudio realizado por Pineda y colaboradores en España en 613 individuos que conviven con el VIH, encontró que el 86% tenían recuentos de células T CD4 >200 células/mm³ y el 26% presentaban anticuerpos IgG anti-VHE, y en uno de los individuos seropositivos se logró detectar ARN del VHE. En este mismo estudio, al realizar un análisis multivariado los autores encontraron una asociación entre la edad y el sexo masculino con la exposición al VHE, otras variables como los niveles plasmáticos de ALT, gamma-glutamil transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST) y fibrosis hepática (evaluada por elastografía hepática), fueron similares tanto en los individuos seronegativos como en los seropositivos para VHE. Adicionalmente, de los 613 individuos se tuvo

una subpoblación de 417 seropositivos y 196 seronegativos anti-VHC, cuando en el análisis excluyeron la subpoblación seropositiva para VHC, los pacientes expuestos al VHE tuvieron valores anormales de AST, GGT y una mayor frecuencia de rigidez hepática²⁷.

Un estudio realizado en Barcelona en 238 individuos convivientes con VIH bajo terapia antirretroviral y 200 individuos sanos (grupo control), demostró una seroprevalencia del VHE de 9,2%, y la presencia de estos anticuerpos se asoció con las variables de inmunosupresión, enfermedad hepática, trasplante hepático, cirrosis hepática e infección por VIH. Además, se observó una mayor seroprevalencia en los individuos con recuentos de células T CD4⁺<200 células/mm³, sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ²⁸.

Lindemann y colaboradores en el 2015, en un estudio con 448 individuos que conviven con el VIH, encontraron una seroprevalencia de IgG anti-VHE de 10,4% (45/448), y solo un individuo tenía ARN del VHE, este individuo no tenía valores elevados de ALT y los recuentos de células T CD4⁺ eran de 180 células/mm³. Adicionalmente, entre los 45 individuos con anticuerpos IgG anti-VHE, 3 tenían anticuerpos IgM anti-VHE, no se detectó el ARN del VHE en ninguna de estas muestras y solo 6 tenían niveles de ALT dos veces por encima del rango de referencia. No se encontraron asociaciones significativas entre el sexo, la edad y los recuentos de células T CD4⁺ con la presencia de anticuerpos²⁹.

Un estudio prospectivo realizado por Rivero-Juárez y colaboradores en 894 individuos convivientes con VIH, reveló una seroprevalencia de 9,8% (88/894), de los cuales a 5 individuos se les detectó el ARN del VHE. De estos individuos, 3

tenían recuentos de células T CD4⁺ <303 células/mm³ y 2 >303 células/mm³, y en ninguno se encontró ARN del VHE seis meses después. No se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de anticuerpos anti-VHE y el recuento de células T CD4⁺³⁰.

En Francia, se han reportado cifras de seroprevalencia del VHE que varían entre 1,5% y el 9% en individuos convivientes con el VIH^{31,32}; en Italia entre 2% y el 19,4%^{33,34} y en Estados Unidos se ha reportado una seroprevalencia del 19%³⁵. En América latina, si bien los estudios de seroprevalencia son escasos, en una cohorte de 484 individuos que conviven con el VIH en Argentina, se reportó una frecuencia de anticuerpos IgG anti-VHE del 6.7%, en este estudio como grupo control se incluyeron donantes de sangre voluntarios, encontrándose una asociación significativa entre la frecuencia de anticuerpos anti-VHE y la infección por VIH³⁶. En Brasil, en un estudio en 354 individuos que conviven con el VIH, se reportó una frecuencia de anticuerpos de IgG e IgM anti-VHE de 10,7% y 1,4%, respectivamente; la mediana de células T CD4⁺ de los individuos fue de 530,5 células/mm³, no se detectó el ARN del VHE y no se encontraron asociaciones significativas con ningún factor de riesgo³⁷. En este mismo país, Moss da Silva y colaboradores, en una cohorte de 360 convivientes con el VIH, encontraron que un 6,7% (24/360) de los individuos tenían anticuerpos IgG anti-VHE y en 8 de los individuos sin anticuerpos anti-VHE se detectó el ARN viral, que tras análisis filogenéticos pudieron definir que pertenecían al genotipo VHE3. Se encontraron asociaciones significativas entre la edad avanzada, el estado civil, múltiples parejas sexuales, saneamiento deficiente y consumo de alcohol con la presencia de

anticuerpos anti-VHE. El promedio de los recuentos de células T CD4⁺ en esta población fue de 569,3 células/mm³ y no se encontraron asociaciones significativas con la presencia de anticuerpos anti-VHE³⁸.

Aunque se ha intentado relacionar diversos factores con un mayor riesgo de adquirir la infección por el VHE en individuos inmunocomprometidos, solo se han descrito asociaciones significativas con el incremento de la edad, que parece deberse a un mayor tiempo de exposición al virus²¹; también con ser hombre y el consumo de carne de cerdo contaminada, siendo este animal el principal reservorio de los genotipos VHE3 y VHE4 responsables de generar infección crónica en individuos inmunosuprimidos³⁹. Si bien el genotipo VHE3 parece ser el más prevalente y ha sido identificado solo en algunas regiones en centro y sur América principalmente en cerdos y humanos, la información disponible en América Latina sigue siendo escasa y a la fecha en nuestro país no existe información acerca de la prevalencia de infección del VHE en convivientes con VIH, por lo cual es importante determinar si el virus se encuentra circulando en esta población e identificar los factores de riesgo prevalentes y los genotipos asociados a la infección. Dicha información es de vital importancia para implementar estrategias encaminadas al control de la transmisión, tratamiento y prevención de posibles complicaciones asociadas a la infección.

3.2 Marco teórico

3.2.1. Descripción del virus

El VHE fue reconocido como una hepatitis viral no A, no B, por primera vez en 1978 en una epidemia que se presentó en el Valle de Cachemira, India, donde se

presentaron 52.000 casos de hepatitis icterica con 1.700 muertes, transmitida a través de agua contaminada y ninguno de los individuos presentaba marcadores séricos para VHA y VHB. En 1983, el Dr. Balayan observó el virus por microscopía electrónica en muestras provenientes de un brote de hepatitis inexplicable en soldados rusos que se encontraban en Afganistán. Su genoma fue secuenciado en 1991 lo cual significó un avance importante para el desarrollo de pruebas diagnósticas, permitiendo ahondar en la epidemiología de la enfermedad⁴⁰.

El VHE pertenece a la familia *Hepeviridae*, género *Orthohepevirus A*, y presenta una cápside icosaédrica que mide aproximadamente entre 27 a 34 nm. El VHE presenta dos tipos de partículas virales infecciosas; las partículas virales presentes en heces y en bilis que no presentan envoltura (partículas virales desnudas), haciéndolas resistentes a las condiciones del tracto gastrointestinal y del medio ambiente, favoreciendo su transmisión fecal-oral; y las partículas virales que se encuentran circulando en sangre que están cubiertas con una membrana celular pero no expresan glicoproteínas virales sobre la superficie, denominada pseudo envoltura (partículas virales pseudo envueltas), permitiéndole evadir la respuesta inmune e infectar otras células de otros órganos como intestino delgado, colon y ganglios linfáticos⁴¹.

Es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva, con una longitud de 7,200 nucleótidos, el genoma del VHE está compuesto por 3 marcos de lectura abiertos [ORF, (open reading frame)] y el genotipo VHE1 tiene un ORF adicional denominado 4. El ORF1 codifica una poli proteína no estructural proORF1 que tiene dominios funcionales necesarios para la replicación del virus, transcripción, procesamiento de

proteínas y adaptación del virus al hospedero. Estos dominios incluyen una metiltransferasa, una proteasa, una ARN helicasa, y una polimerasa dependiente de ARN. El ORF2 codifica la proteína para la cápside, la cual es importante para la interacción con la célula del hospedero y para la inducción de la respuesta inmune, tiene tres sitios de glicosilación y una vez glicosilada se auto ensambla y forma la subunidad de la cápside viral y su péptido señal amino terminal promueve su translocación hacia el retículo endoplásmico. La proteína tiene tres dominios: S, M y P, dentro del dominio P se encuentran los epítopes que desencadenan la formación de anticuerpos neutralizantes y se cree está involucrado en la unión con el receptor celular de proteoglicano heparán sulfato, razón por la que es utilizada para el desarrollo de pruebas diagnósticas y posibles vacunas. El ORF3 codifica una proteína necesaria para la liberación de los viriones, también desempeña funciones reguladoras interactuando con varias proteínas que participan en vías de señalización de supervivencia o antiapoptótica, evitando la muerte celular, lo cual ayuda al establecimiento de la infección persistente^{42,43}. El genoma del VHE es generalmente estable, excepto la región hipervariable ubicada en el ORF1, donde se presentan sustituciones del ARN que no representan cambios en la secuencia de aminoácidos. El ORF4 solo se encuentra presente en el genotipo VHE1 y codifica para una proteína cuyo fin es aumentar la replicación viral bajo situaciones de estrés⁴¹ (figura 1).

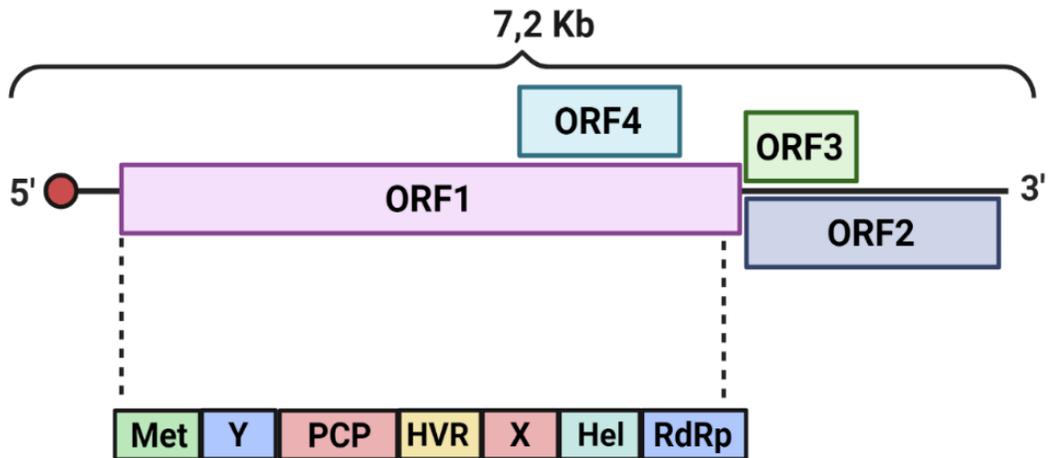


Figura 1. Genoma del VHE. El ORF1 codifica para una poliproteína que tiene dominios funcionales denominados: metiltransferasa (Met), cistein proteasa (PCP), región hipervariable (HVR), helicasa (Hel) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). También incluye las regiones Y, HVR y X. ORF2, ORF3 y ORF4 del genoma del VHE. La figura fue creada en Biorender.com

3.2.2. Ciclo replicativo del VHE

El VHE es un virus hepatotrofo y se ha sugerido que, para su ingreso a la célula, el heparán sulfato proteoglicano (HSPG) podría funcionar como un receptor viral. En experimentos *in vitro*, la partícula viral pseudo envuelta parece tener una cinética de entrada a la célula más lenta y lineal, dado que carece de expresión de glicoproteínas virales en su superficie^{44,45}; una vez esta partícula viral pseudo envuelta llega al citoplasma a través de endocitosis mediada por clatrina, el ARN viral genómico de sentido positivo se expone y se traduce para producir la poliproteína ORF1 que contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN, quien a su vez copia la cadena de sentido positivo en intermediarios de sentido negativo que sirven de molde para que la ARN polimerasa sintetice nuevas copias del ARN-VHE genómico y subgenómico. Las proteínas que se codifican a partir del ORF2 y

ORF3 se traducen a partir del ARN subgenómico, estas proteínas sufren modificaciones como glicosilación, fosforilación y palmitoilación. Las proteínas del ORF2 permite el ensamblaje y empaquetamiento del genoma para la generación de nuevos viriones y la proteína ORF3 interactúa con el gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101) que es un componente central del complejo ESCRT-I, y es utilizado por varios virus para la gemación de los viriones^{45,46}. Las partículas virales liberadas por la membrana apical del hepatocito ingresan al conducto biliar y allí por acción de los ácidos biliares se degrada la envoltura lipídica y se dirigen a tracto gastrointestinal; mientras que, las partículas liberadas por la membrana basal del hepatocito se dirigen a sangre y conservan su pseudo envoltura sirviendo como un mecanismo de defensa contra anticuerpos neutralizantes inducidos previamente contra la cápside de las partículas no envueltas⁴³ (figura 2).

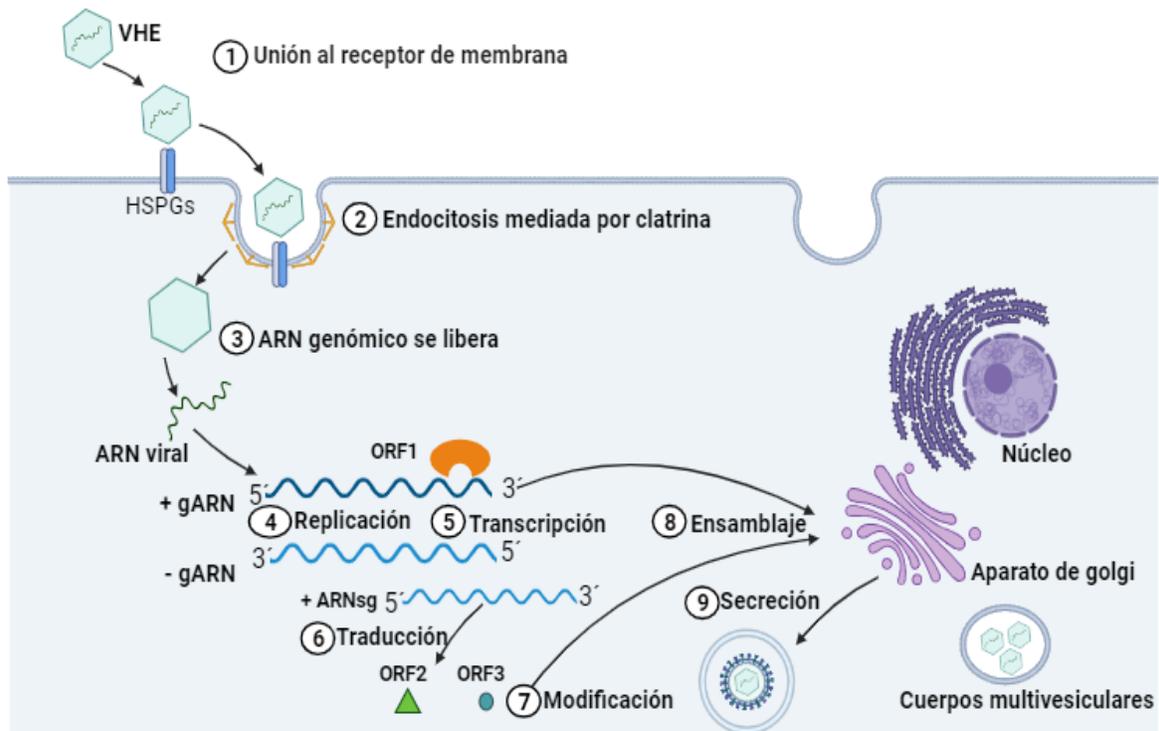


Figura 2. Ciclo de replicación del VHE. (1) la partícula viral se une al hepatocito; (2) ingresa por endocitosis; (3) el ARN genómico viral es liberado en el citosol; (4) producción de la poliproteína ORF1; (5) generación de intermediarios de ARN negativos; (6) síntesis de ARNm genómico y subgenómico; (6) traducción de la proteína ORF2 y ORF3; (7) estas proteínas sufren modificaciones post traduccionales; (8) la proteína de la cápside se auto ensambla para formar viriones; (9) el ORF3 se TGS101 facilitando la gemación de los viriones.

La figura fue creada en Biorender.com.

3.2.3. Epidemiología de la infección por VHE

El VHE es uno de los principales agentes etiológicos de hepatitis entérica. De acuerdo con la OMS cada año se presentan 20 millones de casos de Hepatitis E en el mundo, de estos 3.3 millones son sintomáticos. Para el año 2015 se estimaron 44,000 muertes debidas a esta infección, representando el 3.3% de las muertes por infecciones atribuidas a hepatitis virales⁵. En países en desarrollo, este virus afecta principalmente a adultos jóvenes entre 15 y 30 años, mientras que en países desarrollados afecta a adultos de edad media o mayores de 55 años. La tasa de

mortalidad oscila entre el 0.5% al 4.0%, aunque en mujeres embarazadas puede alcanzar el 30% durante el tercer trimestre del embarazo⁴⁷.

El VHE se puede caracterizar genotípicamente a través de análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos especialmente de regiones del ORF1 y ORF2⁴⁸, las cuales se comparan con las secuencias del genoma completo del virus disponibles en GenBank®. Actualmente se encuentran aproximadamente 642 secuencias y la identificación de cada genotipo se basa en las diferencias genéticas >20% principalmente del ORF2⁴⁹. A la fecha se han descrito 8 genotipos del VHE, de los cuales los genotipos VHE1, VHE2, VHE3, VHE4 y recientemente descrito el VHE7 están implicados en infección en humanos; los genotipos VHE5, VHE6 y VHE8 solo se han reportado que están presentes en reservorios animales (jabalís y camellos)⁶. La infección producida por los genotipos VHE1 y VHE2 es frecuente en países con escasos recursos económicos y poco acceso al agua potable como: zonas de conflicto civil, campos de refugiados y zonas deficientes en infraestructura sanitaria. La infección suele presentarse por el consumo de agua contaminada con heces de personas o animales infectados, originando grandes brotes de la enfermedad por lo que se conoce como patrón hiperendémico^{8,50}.

Este patrón se ha observado principalmente en países de Asia, África y algunos países de América Latina (como Uruguay, Venezuela, Cuba y México), donde hasta un 15% de los infectados presentan enfermedad aguda⁴⁷; la infección se presenta de forma endémica por estos mismos genotipos en regiones con mejores condiciones sanitarias y socioeconómicas, tiene las mismas características clínicas presentadas en el patrón hiperendémico y se han reportado casos en países de Oriente medio y sur de Asia, donde la infección por VHE representa un 25% de las hepatitis agudas y una minoría presentan hepatitis fulminante e insuficiencia hepática aguda, asociada principalmente a la infección por el genotipo VHE1^{8,46}.

La infección por el genotipo VHE3 y en menor proporción por el genotipo VHE4⁸; presenta un patrón no endémico con infecciones esporádicas, usualmente en países desarrollados de Europa, Norteamérica y el Este de Asia; la transmisión es de tipo zoonótico, se presenta principalmente por el consumo de carne de cerdo contaminada mal cocida. La infección por estos genotipos se presenta principalmente en adultos mayores, quienes tienen un 8% a un 11% de probabilidad de desarrollar insuficiencia hepática aguda^{51,52}. En individuos inmunocomprometidos el genotipo VHE3 puede producir una hepatitis crónica y viremias prolongadas con desarrollo de cirrosis y hepatitis fulminante^{53,54,55,56}.

La transmisión de tipo zoonótico constituye un mayor riesgo para veterinarios y porcicultores por el estrecho contacto con estos animales, en quienes se ha reportado que la seroprevalencia es respectivamente de 1,5 a 3,5 veces mayor, en comparación con la población general y donantes de sangre⁵⁷. En China donde es

común la crianza mixta de animales domésticos, se demostró la presencia del genotipo VHE4 en vacas y su excreción a través de la leche, sugiriendo este como otro mecanismo para adquirir la infección⁵⁸. El genotipo VHE3 se encuentra distribuido principalmente en América, Europa, Asia, y el genotipo VHE4 en Japón y China⁴⁰, también se han reportado estos genotipos en países en desarrollo de América Latina⁸.

América era una región considerada no endémica para el virus, probablemente debido a los pocos estudios realizados en esos países¹³; sin embargo, dos brotes importantes de Hepatitis E en humanos se registraron en México. El primero de estos se presentó en la aldea rural de Huitzililla en 1986 con 94 casos que presentaron ictericia. El segundo brote se presentó ese mismo año en la aldea de Telixtac con un reporte de 129 casos, ambos brotes se asociaron con el consumo de agua contaminada con el virus, ya que el análisis por microscopía electrónica de muestras de heces provenientes de ambas localidades determinó que eran partículas virales de 32 a 34 nm similares a las observadas en casos de hepatitis de transmisión entérica no A, no B en Asia⁵⁹. México, a pesar de ser considerado un país endémico para la infección, presenta seroprevalencias bajas de 3,4% en grupos indígenas Tepehuanos⁶⁰ y de 3% en pacientes pediátricos⁶¹. De otro lado, se ha descrito una seroprevalencia de 36,6% en poblaciones rurales con una mayor exposición al virus¹³. Adicionalmente, se han reportado seroprevalencias del 59,4% en cerdos de diferentes regiones de México⁶², mientras que en el centro de este país se han reportado seroprevalencias del 30,8%⁶³. Venezuela fue el primer país de Suramérica en reportar la seroprevalencia de anticuerpos anti-VHE de 1.6% en

gestantes del área urbana, 3.9% en una población rural y en 5.4% de amerindios rurales⁶⁴. Además, en Argentina se han realizado estudios de seroprevalencia del VHE encontrando cifras de 4,4% en población general y 11,3% en donantes de sangre^{65,66}, de igual manera, en Brasil las cifras de seroprevalencia varían ampliamente reportándose en donantes de sangre cifras que va desde 0,44%⁶⁷ hasta 10,0%⁶⁸ y en poblaciones rurales desde 2,0%⁶⁹ hasta 13%⁷⁰, en Uruguay se ha reportado una seroprevalencia del VHE en donantes de sangre del 10%⁷¹ y en Colombia, se ha detectado la circulación del virus en individuos con diagnóstico de hepatitis virales, en aguas residuales y en cerdos^{17,72,73}.

3.2.4. Patogénesis de la infección

El VHE ingresa principalmente a través del consumo de agua contaminada con las heces de personas o animales infectados o por el consumo de carne de cerdo contaminada mal cocida⁴⁵. La partícula viral pseudo envuelta o sin envoltura llega al hígado a través de la vena porta y en el citoplasma de los hepatocitos se replica y se acumula en la bilis, aunque también se ha reportado la replicación en células del intestino delgado y colon⁷⁴.

El pico de replicación del virus en los hepatocitos es consistente con la presencia del ARN viral en bilis y heces, así como también con los cambios morfológicos de la célula hepática asociados con una elevación de la enzima ALT, seguido de síntomas clínicos como fiebre, dolor abdominal, anorexia, náuseas, emesis y, en algunos casos, ictericia y hepatomegalia, haciéndola indistinguible de otras enfermedades hepáticas agudas; una vez se resuelve la infección, los niveles de ALT vuelven a la normalidad y desaparecen los síntomas^{6,75}. El virus puede

detectarse en sangre desde el periodo de incubación (2-10 semanas posterior a la exposición inicial) e inicio de los síntomas de la infección y hasta la 4-8 semanas después del inicio de los síntomas, y en algunas ocasiones persiste hasta la semana 16. También se ha demostrado que puede encontrarse en heces a partir de la segunda semana de la exposición, y hasta el sexto mes^{40,60}. Aproximadamente el 95% de los individuos infectados por el VHE presentan un cuadro asintomático⁴⁵. Las mujeres embarazadas, especialmente en el tercer trimestre tienen un mayor riesgo de desarrollar una hepatitis fulminante debido a la infección por el VHE, particularmente en áreas endémicas para los VHE1 y VHE2⁷⁶.

Adicionalmente el desarrollo de infección crónica por el VHE ha sido reportada en individuos inmunosuprimidos como trasplantados, con malignidades hematológicas e individuos que conviven con el VIH, este tipo de infección se ha asociado principalmente a los genotipos 3 y 4^{77,78,79,80}.

La mortalidad asociada con hepatitis fulminante es de aproximadamente 1% en la población general⁸¹ y parece estar asociado con factores virales como sustituciones sinónimas y no sinónimas o mutaciones en la región de la metiltransferasa del ORF1 en las secuencias de los 4 genotipos del VHE que infectan a humanos^{82,83}. En estudios realizados en estos individuos se han encontrado títulos elevados de anticuerpos IgG e IgM comparados con aquellos que sufren una infección autolimitada, los cuales tienen mayor infiltración hepática por células T CD4⁺ y T CD8⁺, sugiriendo que una respuesta inmune exacerbada se asocia con enfermedad grave por el VHE⁴⁵. Las manifestaciones extra hepáticas pueden presentarse durante o posterior a una infección aguda o crónica por el VHE, siendo más común

en las infecciones crónicas que se establecen en individuos inmunosuprimidos, lo cual favorece la generación de cuasi especies con tropismo hacia otros órganos o tejidos⁸⁴. Los mecanismos por los cuales el VHE produce manifestaciones extrahepáticas son aún desconocidos; sin embargo, se postula que puede deberse directamente a la replicación del virus en esos tejidos o indirectamente por mecanismos inmunes como el mimetismo molecular, generando una enfermedad autoinmune. Aunque este mecanismo no se ha dilucidado completamente, se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos en individuos con el VHE generando una polineuropatía inflamatoria autoinmune^{23,85}. Por otro lado, los complejos inmunes de antígenos virales con anticuerpos también podrían contribuir al desarrollo de manifestaciones extra hepáticas²³. En estudios realizados en India y en Holanda entre un 5 a un 10% de los individuos que tenían una infección aguda por el VHE desarrollaron síndrome de Guillain-Barré, mientras que en el Reino Unido y los Países Bajos el 10% de los pacientes tenían amiotrofia neurálgica⁴⁵.

3.2.5. Coinfección VHE-VIH

El VIH continúa siendo uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Para el año 2020, 37,7 millones de personas convivían con el VIH en todo el mundo, además, para este año se reportaron 680,000 muertes a causa de infecciones relacionadas con esta infección y 1,5 millones de personas contrajeron este virus⁸⁶. Esta infección viral es probablemente la inmunodeficiencia más conocida y en casos graves se manifiesta como el síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El VIH tiene como blanco las células del sistema inmunológico, particularmente aquellas que expresan el receptor CD4 como son las células T

CD4⁺, aunque también puede infectar macrófagos y células dendríticas. El número de células T CD4⁺ disminuye gradualmente por distintos mecanismos adicionales al efecto citopático del virus, uno de ellos es la alteración en la redistribución en las células T CD4⁺, debido a la acumulación de partículas virales en los órganos linfoides secundarios secuestrando las células T en esta zona. También se ha reportado que la replicación viral provoca un bloqueo en la generación de nuevos linfocitos por el timo y la médula ósea. Existen mecanismos de destrucción indirecta generados por la propia respuesta inmune del individuo y por el efecto tóxico de proteínas virales, por tal razón la infección se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmune, debido a la reducción en el repertorio de células T CD4⁺ reduciendo la capacidad del sistema inmune para reconocer diferentes microorganismos patógenos y oportunistas^{87,88}.

En la infección reciente por VIH la carga viral en sangre se detecta desde la primera semana y aumenta exponencialmente. Los anticuerpos tardan de 3 a 4 semanas en ser detectados tiempo denominado periodo de ventana. Sin embargo, las técnicas serológicas de cuarta generación acortan este periodo a sólo 14-15 días, debido a que incluyen la detección del antígeno-p24. Durante este tiempo no es posible hallar una respuesta humoral ni celular, a pesar de existir viremias muy elevadas. Durante la infección crónica el sistema inmune controla la replicación viral y se produce una caída de la viremia que puede llegar a niveles indetectables (<40-74 copias/ml ARN viral) alcanzando un nivel estable y puede variar de individuo en individuo, dependiendo del equilibrio entre la replicación y el control inmune, lo cual determina la velocidad de la evolución a SIDA. Por último, en los estadios finales de la

enfermedad se da un descenso en los recuentos de las células T CD4⁺ y una elevación de la carga viral, evidenciando el deterioro del sistema inmune⁸⁷.

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) es el tratamiento para la infección por VIH, la cual consiste en una combinación de fármacos, para aumentar la potencia y reducir la probabilidad de desarrollar resistencia. Los medicamentos antirretrovirales aprobados por la FDA comprenden los Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN), Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN), Inhibidores de la proteasa (IP), Inhibidores de la fusión, Antagonistas de CCR5, Inhibidor de la transferencia de cadenas de la integrasa (INSTI), Inhibidores de la fijación e Inhibidores pos fijación. Estos medicamentos inhiben la replicación viral y aumentan los recuentos de células T CD4⁺ a través de la reducción en la apoptosis de estas células y una redistribución de las mismas en el tejido linfoide^{89,90}. Según estudios de cohortes la recuperación de las células T CD4⁺ se logra al menos en 5 años de TARGA cuando al momento de iniciar el tratamiento los recuentos son inferiores a 500 células/mm³⁹¹.

La evaluación del estadio clínico del paciente con el VIH es un pilar dentro de los programas de promoción de la salud, que facilita el cuidado de los pacientes con guías de seguimiento y tratamiento apropiados evitando la progresión de la enfermedad y previniendo infecciones oportunistas, lo cual redundará en una mayor supervivencia y mejor pronóstico⁹². En la tabla 1 se describe la clasificación del VIH de acuerdo al CDC, de acuerdo a las categorías clínicas e inmunológicas. La categoría clínica A se caracteriza por una infección asintomática de VIH y

linfadenopatía generalizada persistente e infección aguda; la categoría clínica B en la que se incluyen todas las afecciones sintomáticas, las condiciones se atribuyen a un defecto en la inmunidad mediada por las células T y algunas de estas manifestaciones son: candidiasis, síntomas constitucionales como fiebre (38,5°C) o diarrea que dura más de 1 mes, entre otros; y por último, en la categoría C se incluyen todas las condiciones definitorias de SIDA como infecciones por patógenos oportunistas principalmente coccidioidomicosis, criptococosis, neumonía por *pneumocystis jiroveci* y toxoplasmosis (tabla 1). Como se ha mencionado anteriormente, la patogénesis de la infección por VIH es atribuible en gran medida a la disminución en las células T CD4⁺, por tal razón es importante una clasificación inmunológica en la que se evalúa la cifra absoluta (por mm³) o el porcentaje de las células T CD4⁺. Según la clasificación del CDC hay 3 categorías de acuerdo al número de células T CD4⁺ que se combinan con las categorías clínicas basadas en la sintomatología (tabla 1)⁹³.

Tabla 1. Clasificación del VIH de acuerdo al CDC en relación a las categorías clínicas e inmunológicas

Recuentos de linfocitos T CD4 ⁺	Categorías clínicas		
	A. Infección asintomática	B. Infección sintomática	C. Condiciones indicadoras de SIDA
1. ≥ 500 células/mm ³	A1	B1	C1
2. 200-499 células/mm ³	A2	B2	C2
3. < 200 células/mm ³	A3	B3	C3

La mortalidad por enfermedad hepática en los individuos que conviven con el VIH ocupa el segundo lugar después de la mortalidad a causa del SIDA, lo cual se ha

atribuido principalmente a la infección con virus hepatotropos y a la hepatotoxicidad inducida por fármacos en la terapia antirretroviral. Sin embargo, existen otras causas de enfermedad hepática en estos individuos como el alcoholismo y enfermedad del hígado graso no alcohólico. La co-infección con virus hepatotropos favorece el desarrollo de hepatitis crónica, causada principalmente por el VHB y VHC, además, el VHD acelera el curso de la enfermedad hepática relacionada con el VHB y en individuos que conviven con el VIH la presencia de esta co-infección (VHB/VHD) se ha asociado con una mayor incidencia de complicaciones hepáticas y un aumento en la mortalidad^{94,95}. En los últimos años la infección por el VHE también se ha asociado con hepatitis crónica en individuos que conviven con el VIH, particularmente aquellos que presentan un recuento de células TCD4⁺ <250 células/mm³²¹. La incidencia de la infección por el VHE en individuos que conviven con el VIH varía entre 0 y 15,4%. Dos estudios realizados en España reportaron tasas de incidencia de 2,4%⁹⁶ y 6,5%⁹⁷, respectivamente, un estudio en China del 15,4%⁹⁸ y en Tanzania de 1%⁹⁹. Estudios epidemiológicos realizados en individuos que conviven con el VIH han evaluado varios factores de riesgo para la infección por el VHE, como lo son etnia, edad, género, uso de drogas intravenosas, consumo de carne de cerdo o contacto estrecho con estos animales y acceso a agua potable, encontrando que solo las últimas están asociadas estadísticamente con la infección. Adicionalmente en países desarrollados la infección se presenta predominantemente en hombres mayores de 40 años¹⁰⁰. Así mismo, la existencia previa de cirrosis hepática en estos pacientes se ha asociado con mayor prevalencia de VHE, explicado probablemente por la disminución en la síntesis de proteínas del sistema inmune innato y de receptores de reconocimiento de patrones [PRRs

(pattern-recognition receptors)], así como a la función defectuosa de las células NK, importantes para la respuesta inmune antiviral²². Los mecanismos de transmisión no difieren a los presentados en individuos inmunocompetentes y las manifestaciones clínicas en la infección aguda son similares a las presentadas en otras hepatitis virales como fatiga, fiebre, dolor articular e ictericia. Cuando la infección se vuelve crónica se presentan estos mismos síntomas que pueden progresar a cirrosis y fibrosis hepática; la prevalencia de infección crónica en estos individuos ha sido descrita entre un 0 y 0.5%^{21,22}; caracterizada por la presencia de ARN viral en heces y suero por más de tres meses, acompañado por variaciones fluctuantes de ALT y presencia de anticuerpos IgG e IgM, siendo este uno de los principales factores de riesgo para la persistencia de la infección por VHE y progresión a enfermedad grave^{31,101}. La principal consecuencia de esta infección es el posible desarrollo de una infección hepática crónica que puede tener como desenlace una esteatosis, fibrosis e incluso cirrosis, además que se han reportado manifestaciones extrahepáticas como disfunciones renales y síndromes neurológicos³¹.

En los últimos años han aumentado los estudios de seroprevalencia del VHE en individuos que conviven con VIH, demostrando la circulación del virus a nivel mundial. En regiones de Asia se alcanza cifras hasta un 30,1%¹⁰² y en África cifras mayores de hasta 45,3%²⁶; mientras que en países de Europa la seroprevalencia se ha reportado desde 4.4% hasta 19,4%^{34,103} (tabla 2).

La presencia de anticuerpos contra el VHE en individuos que conviven con el VIH se ha asociado con recuentos de células T CD4⁺ <100-200 células/mm³ como se ha

reportado en España²⁵, Ghana, Cameroon²⁴, Suiza¹⁰⁴, Francia⁸⁰, China¹⁰⁵, Estados Unidos¹⁰⁶. En países de América Latina, si bien la información es escasa, un estudio del 2016 en Argentina reportó la asociación entre la prevalencia de anticuerpos IgG y los recuentos bajos de células T CD4⁺¹⁰⁷. Sin embargo en Brasil se han realizado varios estudios en esta población sin encontrar dicha asociación^{37,38,108} (tabla 2).

Tabla 2. Seroprevalencia del VHE en individuos que conviven con el VIH en países de varias regiones del mundo.

Región/país	Porcentaje (%) Anti-VHE IgG
América	
Argentina ^{36,107}	6,7-7,3
Brasil ^{37,38,108}	4,1-6,7-10,7
Estados Unidos ^{35,106}	6,0-19,5
Europa	
Foggia y Nápoles, Italia ¹⁰⁹	6,7
Inglaterra ³⁹	9,4
Grecia ¹¹⁰	7,3
Holanda ¹¹¹	11,7
España ^{29,103}	9,0-10,4
Italia ³⁴	19,4
Francia ⁸⁰	4,4
Suiza ¹⁰⁴	2,6
Asia	
Camboya ¹⁰²	30,1
China ¹⁰⁵	42,0
África	
Nigeria ¹¹²	30,0
Ghana y Camerún ²⁶	14,2-45,3

3.3 Planteamiento del problema

En nuestro país la infección por el VHE no es de notificación obligatoria, ni se contempla la búsqueda rutinaria de la infección de este virus, sugiriendo falta de atención a esta problemática tanto en la población general como en la población de individuos inmunosuprimidos. En Colombia, algunos estudios, han demostrado la circulación del VHE en grupos poblacionales, por ejemplo, un estudio prospectivo en pacientes con diagnóstico de hepatitis viral, que por medio de análisis filogenéticos se identificó el genotipo VHE3 asociado a la infección. Adicionalmente en Antioquia se ha reportado la presencia del virus en cerdos y en aguas residuales^{72,73,113}. A pesar de estos antecedentes, a la fecha en nuestro país no hay estudios que establezcan cuál es la frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos anti-VHE y la infección por el VHE, ni los posibles factores de riesgo que puedan asociarse con esta infección. Su conocimiento es de gran importancia porque permitiría el desarrollo de estrategias de salud pública ayudando a controlar la transmisión y los factores asociados a la infección, así como en el desarrollo de protocolos para su diagnóstico oportuno, evitando posibles cuadros de hepatitis crónica o grave. Los resultados de esta investigación podrían ser de relevancia como fuente de datos para la toma de decisiones, las políticas de salud y el manejo del paciente co-infectado VIH/VHE.

4. Objetivos, hipótesis y pregunta de investigación.

4.1. Objetivo general

Determinar la seroprevalencia e infección del virus de Hepatitis E en individuos que conviven con el VIH, que hacen parte del programa de atención integral a pacientes en una IPS de la ciudad de Medellín.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Describir las variables socioeconómicas, sociodemográficas y clínicas de los individuos que conviven con el VIH que hacen parte del programa de atención integral a pacientes con esta infección en una IPS de Medellín.

4.2.2. Determinar la frecuencia de individuos que conviven con el VIH que presentan anticuerpos IgG e IgM específicos contra el VHE.

4.2.3. Describir las variables socioeconómicas, sociodemográficas y clínicas de los individuos con anticuerpos IgM e IgG anti-VHE y determinar si existe asociación entre estas variables con la presencia de anticuerpos.

4.2.4. Determinar la presencia del ARN del VHE en los individuos que conviven con el VIH que se incluyeron en el estudio.

4.3. Hipótesis.

Entre un 4,0% y un 20% de individuos que conviven con el VIH y hacen parte del programa de atención integral a pacientes con esta infección en una IPS de la ciudad de Medellín, han estado en contacto con el VHE, demostrado por la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-VHE y la detección del genoma viral.

4.4. Preguntas de investigación

¿Los individuos que conviven con el VIH pueden estar infectados con VHE y presentar anticuerpos específicos contra el virus?

¿La seropositividad o la presencia del ARN del VHE podría asociarse con factores sociodemográficos, hábitos higiénicos, estados de salud del individuo?

5. Metodología

5.1 Diseño del estudio y muestra

Estudio descriptivo transversal en una muestra de 430 individuos que fueron seleccionados aleatoriamente entre 1566 pacientes que conviven con el VIH que hacen parte del programa de atención integral a pacientes en una IPS de Medellín. El tamaño de muestra de 430 individuos, se obtuvo teniendo en cuenta una prevalencia del 6,6% del VHE en individuos que conviven con el VIH en un estudio de Argentina, con una significancia del 95% y una precisión en el intervalo de confianza del 2%.

Para el estudio se utilizó un muestreo aleatorio simple. Esta técnica permite obtener una muestra representativa de la población, dándole a cada individuo la misma posibilidad de ser elegido. En nuestro estudio se asignó a los pacientes números aleatorios obtenidos por medio del programa Epidat 4,2, sin reemplazo, hasta completar el tamaño de muestra.

Dadas las condiciones presentadas en la pandemia y al traslado de los individuos del programa a otra IPS, se dificultó el reclutamiento de los pacientes. Para los análisis inmunológicos y moleculares, se incluyeron en este estudio un total de 133 individuos que hacen parte del programa de atención integral a pacientes con esta infección en una IPS de la ciudad de Medellín. Con base en lo anterior y al disminuir el tamaño muestral a 133 individuos y considerando las variables para el cálculo inicial (prevalencia del 6,6% del VHE en individuos que conviven con el VIH y significancia del 95%), hay un aumento de la precisión en el intervalo de confianza del 4,22%.

Control de sesgos:

Se consideraron como posibles fuentes de error sistemático, los sesgos de selección y medición, y con el fin de controlarlos, se realizó lo siguiente:

- Selección aleatoria de la muestra a partir de la base de datos del programa. Se eligieron los pacientes según números aleatorios obtenidos por medio del programa Epidat 4.2.
- Reunión con el equipo de investigación y los profesionales encargados del contacto inicial de los pacientes: esto se realizó con el fin de recordar las variables medidas en el proyecto, los procedimientos para recoger los datos y recolección de las muestras.
- Estandarización en los procedimientos para recolección, almacenamiento, transporte y procesamiento de las muestras.

Control de sesgos de información

En el encuestador: Los investigadores que realizaron las encuestas tenían un protocolo para avalar el diligenciamiento de las encuestas, incluía la rutina de llegada, presentación, recolección de la información y la despedida. Además, se aclaraba y se hacía énfasis en la importancia de su desempeño en la recolección de información de calidad, y la importancia de asumir una actitud y un lenguaje respetuoso y cortés además de los aspectos éticos.

En el encuestado: se informaba a los posibles encuestados, sobre la importancia de su participación en el estudio, y sobre las ventajas que podría traer la obtención de la información válida que garantice el buen análisis de los datos proporcionados.

En el instrumento: se realizó una prueba piloto para evaluar las preguntas de la encuesta y la fácil comprensión de ésta por parte de los encuestados (anexo 3).

5.2 Criterios de elegibilidad

Los individuos del estudio fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

-Individuos mayores de edad con diagnóstico confirmado de infección por VIH que hacen parte del programa de atención integral de una IPS de Medellín.

Criterios de exclusión:

-Pacientes con infección confirmada con el VIH que rechacen su participación en el estudio y no firmen el consentimiento informado.

5.3 Consideraciones éticas

El estudio contempló la toma de muestras de sangre periférica de pacientes que conviven con VIH que, de acuerdo con las normas científicas técnicas y administrativas para la investigación en salud contempladas en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, se clasifica en la categoría de investigación como riesgo mínimo. La identidad de los pacientes se mantuvo oculta mediante la asignación de un código con el cual se identificaron las muestras de sangre. El comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia aprobó el protocolo del estudio y el consentimiento informado empleados (Anexo 1 y 2).

Captación y toma de muestra sanguínea

Durante la cita médica de control, cada paciente fue invitado a participar en el estudio por el equipo de investigación y con previa autorización de la IPS responsable de su atención. Durante la entrevista se explicó acerca de la importancia del estudio, sus beneficios y los riesgos durante la toma de muestra sanguínea como hematomas o mareos. Una vez el individuo aceptó voluntariamente participar en el estudio, se procedió a explicar y firmar el consentimiento informado. Durante el mismo momento, se realizó una encuesta estructurada para indagar sobre información demográfica, socioeconómica y de factores de riesgo asociados a la infección por el VHE (Anexo 3). De las historias clínicas se obtuvo información de algunas variables clínicas y de laboratorio.

- **Toma de muestra sanguínea:** A cada individuo se le tomó una muestra sanguínea en un tubo sin anticoagulante de 5 ml, se dejó retraer el coágulo por 15 minutos, posteriormente el suero se separó por centrifugación a 3.600 rpm (revoluciones/minuto) durante 15 minutos. Una vez separado el suero se obtuvieron 4 alícuotas de 500 µL, dos fueron almacenadas en viales de 2 ml a -20 °C para realizar la detección de anticuerpos IgG e IgM a través de una ELISA y dos en crioviales de 2.5 ml a -80 °C para realizar la detección del genoma del VHE a través de una RT-PCR para su posterior genotipificación.

5.4 Detección de anticuerpos anti-VHE

5.4.1. Detección de anticuerpos IgM anti-VHE

Para la detección de anticuerpos IgM se utilizó el estuche comercial de ELISA (HEV Dia.pro, Diagnostic Bioprobes, Milán, Italia) que utiliza antígenos recombinantes específicos del VHE y conservados para los cuatro genotipos del virus (VHE1, VHE2, VHE3 y VHE4), que se han descrito infectan a humanos. El estuche se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras que estaban almacenadas a -20°C fueron descongeladas a temperatura ambiente por 20 minutos antes de su uso, y posteriormente fueron diluidas 1:101 (10 µL de la muestra +1000 µL del diluyente). Se agregó 50 µL del reactivo neutralizante a todos los pozos del plato de ELISA, excepto a los pozos del blanco y controles positivo y negativo. Se agregó 100 µL de control negativo por duplicado, 100 µL de control positivo y 100 µL de las muestras diluidas a cada uno de los pozos respectivos, y se incubaron a 37 °C por 60 minutos. Pasado este tiempo, se realizó el primer lavado utilizando un lavador automatizado (Wallac, Delfia Plate wash, EUA) y programado

con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µL/pozo de solución de lavado = 1 ciclo). Luego se dispensaron 100 µL de la enzima conjugada a cada uno de los pozos, excepto al blanco y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente se realizó un segundo lavado siguiendo las mismas especificaciones del primer lavado. Luego se adicionaron 100 µL del Cromógeno/Substrato a todos los pozos, y la microplaca fue incubada a temperatura ambiente (18-24°C) protegida de la luz durante 20 minutos. Para detener la reacción enzimática se agregaron 100 µl de ácido sulfúrico a cada uno de los pozos y se midió la absorbancia en el lector de ELISA (iMark™, Bio-Rad Laboratories, Inc.), utilizando para la lectura un filtro de 450 nm con corrección a 655 nm, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

5.4.1.1 Cálculo del valor de corte e interpretación de los resultados

Para la interpretación de las densidades ópticas obtenidas en los ensayos de ELISA, se calculó un valor de corte siguiendo las recomendaciones del fabricante, usando la fórmula proporcionada en el estuche comercial (HEV Dia.pro, Diagnostic Bioprobes, Milán, Italia):

Valor de corte (Co) = media de la absorbancia del control negativo DO450nm + 0.250

Para la interpretación de los resultados el valor de densidad óptica de cada muestra (M) se dividió por el valor de corte Co (M/Co), si dicha relación fue <1,0 la muestra se consideró negativa, entre 1,0 y 1,2 equivoca y > 1,2 positiva.

5.4.2. Detección de anticuerpos IgG

Para la detección de anticuerpos IgG se utilizó el estuche comercial de ELISA (HEV Dia.pro, Diagnostic Bioprobes, Milán, Italia) que utiliza antígenos recombinantes específicos del VHE y conservados para los cuatro genotipos del virus (VHE1, VHE2, VHE3 y VHE4), que se han descrito infectan a humanos. El estuche se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras que estaban almacenadas a -20°C fueron descongeladas a temperatura ambiente por 20 minutos antes de su uso. Inicialmente se dispensaron 200 μL del control negativo por triplicado, 200 μL de calibrador por duplicado, 200 μL del control positivo, así como 200 μL del diluyente de muestras a todos los pozos de plato de ELISA. Posteriormente se dispensaron 10 μL de cada muestra en su pozo correspondiente y 50 μL diluyente de ensayo en los pozos de los controles/Calibrador y muestras y se incubaron a 37°C por 45 minutos. Una vez transcurrida esta incubación se realizó el primer lavado en el lavador automatizado programado con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μL /pozo de solución de lavado = 1 ciclo), luego se dispensaron 100 μL de la Enzima Conjugada en todos los pozos, excepto en el A1 (vacío para el blanco) y se realizó la segunda incubación a 37°C por 45 minutos. Luego se realizó otro lavado siguiendo las mismas especificaciones del primer lavado. Se dispensaron 100 μL del Cromógeno/Sustrato en todos los pozos, incluido el A1 y se incubó la microplaca a temperatura ambiente ($18-24^{\circ}\text{C}$) protegida de la luz durante 20 minutos. Finalmente se agregó 100 μL de ácido sulfúrico (10 μM) a todos los pozos para detener la reacción enzimática y se midió la absorbancia en el lector de ELISA, utilizando para la lectura un filtro de 450 nm con corrección a 655

nm, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

5.4.2.1 Cálculo del valor de corte e interpretación de los resultados

Para la interpretación de las densidades ópticas obtenidas en los ensayos de ELISA, se calculó un valor de corte siguiendo las recomendaciones del fabricante, usando la fórmula proporcionada en el estuche comercial (HEV Dia.pro, Diagnostic Bioprobes, Milán, Italia):

Valor de corte (Co) = media de la absorbancia del control negativo DO450nm + 0.350

Para la interpretación de los resultados el valor de densidad óptica de cada muestra (M) se dividió por el valor de corte Co (M/Co), si dicha relación fue <0,9 la muestra se consideró negativa, entre 0,9 y 1,1 equivoca y >1,1 positiva.

5.5 Extracción de ARN VIRAL

Para la extracción de ARN del VHE a partir de muestras de suero, se utilizó el estuche comercial ZR viral ARN kit™ (Zymo Research, USA), el cual fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante. A 300 µL de muestra de suero se le adicionaron 300 µL de ADN/ARN Shield™ manteniendo una relación 1:1 con la muestra, luego se adicionaron 1,200 µL de tampón de ARN viral y se mezcló bien manteniendo una relación 2:1 con el volumen de la muestra y ADN/ARN Shield™. Posteriormente se transfirió la mezcla a una columna IC Zymo-Spin en volúmenes de 600 µL y se centrifugó durante dos minutos a 16,000 rpm, este paso fue repetido

3 veces hasta transferir un volumen total de 1,800 µL; luego se adicionó 500 µL de tampón de lavado a la columna y se centrifugó por 30 segundos a 16,000 rpm, descartando el líquido y repitiendo una vez más este paso de lavado. Luego, se adicionaron 500 µL de etanol y se centrifugó durante 3 minutos a 16,000 rpm, esto con el fin de eliminar los restos del tampón de lavado. Posteriormente se transfirió la columna a un nuevo vial y se realizó una elución con 8 µL de agua libre de DNasa/Rnasa sobre la columna y se centrifugó a 16,000 rpm durante 30 segundos. La concentración del ARN extraído se determinó por espectrofotometría en un nadodrop thermo 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

El mismo día de la extracción se realizaba la RT-PCR para el ARN obtenido, cuando no se podía procesar el mismo día, el ARN se almacenaba a –80°C y se procesaba al día siguiente.

6. Detección del VHE por RT-PCR *in house*

Para determinar la presencia del VHE en las muestras de suero se realizó una RT-PCR utilizando el protocolo de Jothikumar et al. 2006¹¹⁴, el cual amplifica el ORF3 del VHE. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

ORF3-F:5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3',

ORF3-R:5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'

La secuencia de la sonda fue: 5' FAM– TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1-3'

En la RT-PCR se incluyó la detección simultánea de la RNasa P como control interno utilizando los siguientes oligonucleótidos:

RNasa P-F:5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'

RNasaP-R:5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'

La sonda:5' HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3'¹¹⁵

Como control positivo se utilizó cDNA sintetizado a partir de ARN del VHE de aguas residuales perteneciente al genotipo VHE3, que fue donado por el grupo de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia, y para la RNasa P, ARN extraído de hisopados nasofaríngeos donado por el grupo Inmunovirología de la Universidad de Antioquía; como control negativo se utilizó agua libre de ARN y para cada ensayo también se incluyó un control de los reactivos, el cual consistía de una reacción sin muestra. La detección del ARN de ambos genes se realizó por medio de una RT-PCR one step utilizando el estuche comercial NEB Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kits (New England Biolabs, USA), para lo cual se mezclaron en un tubo de reacción 10 µL de Luna Universal One-Step Reaction Mix, 1 µL de Luna WarmStart® RT Enzyme Mix, 1 µL del mix de primers HEV-F, HEV-R y sonda (concentración final en la reacción: 0,64 µM primers, 0,25 µM la sonda) y 1 µL de mix de primers RNasa P-F, RNasa P-R y sonda (concentración final en la reacción: 0,17 µM primers, 0,2 µM la sonda) y 7 µL ARN extraído de cada muestra. Para la amplificación y detección de la fluorescencia se utilizó el termociclador en tiempo real modelo CFX96™ Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc.USA). El protocolo de la PCR se programó en el CFX Manager™ Software, iniciando con una incubación a 55°C por 10 minutos para la transcripción reversa, seguida por la desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto y la amplificación se dio por 45 ciclos a 95°C y 60°C por 1 minuto. Los resultados son presentados gráficamente en curvas

de cinética de fluorescencia para cada ciclo en cada una de las muestras y controles. Para su validación, se tuvo en cuenta que la curva fuera sigmoidea y que el umbral fuera de 50 URF (Unidades Relativas de Fluorescencia) con un cycle threshold (Ct) o umbral del ciclo definido por el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal fluorescente fuese detectada por encima del background de fluorescencia e inferior a 37 para los genes del VHE y RNAsa P.

En las muestras donde no se obtuvo detección de la RNAsa P se volvió a realizar la extracción de ARN y RT-PCR. En caso de no obtener amplificación del gen, las muestras fueron excluidas de los análisis, pues éste constituye el control interno de la técnica. Todos los resultados positivos para el VHE fueron confirmados.

Para determinar el límite de detección y la eficiencia de amplificación de la PCR se generó una curva estándar con diluciones seriadas 1:10 de una concentración de cDNA obtenido de una muestra positiva para el VHE, para así poder obtener una representación gráfica de Ct frente al \log_{10} de las concentraciones de cDNA. La eficiencia de la PCR fue calculada según la fórmula: $E = (10^{-1 / \text{pendiente}}) - 1$ ¹¹⁶.

5.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando software IBM SPSS Statistics versión 21. Para el análisis descriptivo de las variables cualitativas, se calcularon distribuciones de frecuencia absolutas con sus respectivos porcentajes y se construyeron tablas de frecuencia, y para las variables numéricas se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión, a éstas se les evaluó la normalidad utilizando la prueba de Shapiro Wilk. Para determinar la frecuencia de individuos

que conviven con el VIH que presentaban anticuerpos IgG e IgM anti-VHE, se calcularon frecuencias absolutas con sus respectivos porcentajes.

Análisis de asociación

Se realizó un análisis bivariado con tablas de contingencia utilizando la prueba exacta de Fisher, para determinar la asociación entre la variable dependiente (presencia de anticuerpos IgG) e independientes (variables sociodemográficas, socioeconómicas, de hábitos higiénicos y clínicas).

Adicionalmente, se realizó una regresión logística multivariada, en la cual se calcularon OR (Odds ratio). Esta medida de asociación se utilizó teniendo en cuenta el valor obtenido para la frecuencia de individuos con anticuerpos IgG anti-VHE (15%), ya que, podría presentarse una sobreestimación de la asociación cuando son porcentajes superiores al 20%. Además, el modelo de regresión del OR tiene una buena estabilidad generando un mejor ajuste de las variables. En todos los casos se tuvo en cuenta un intervalo de confianza al 95% (IC95%). Para todas las pruebas un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

En la figura 3, se describe la metodología general del estudio.

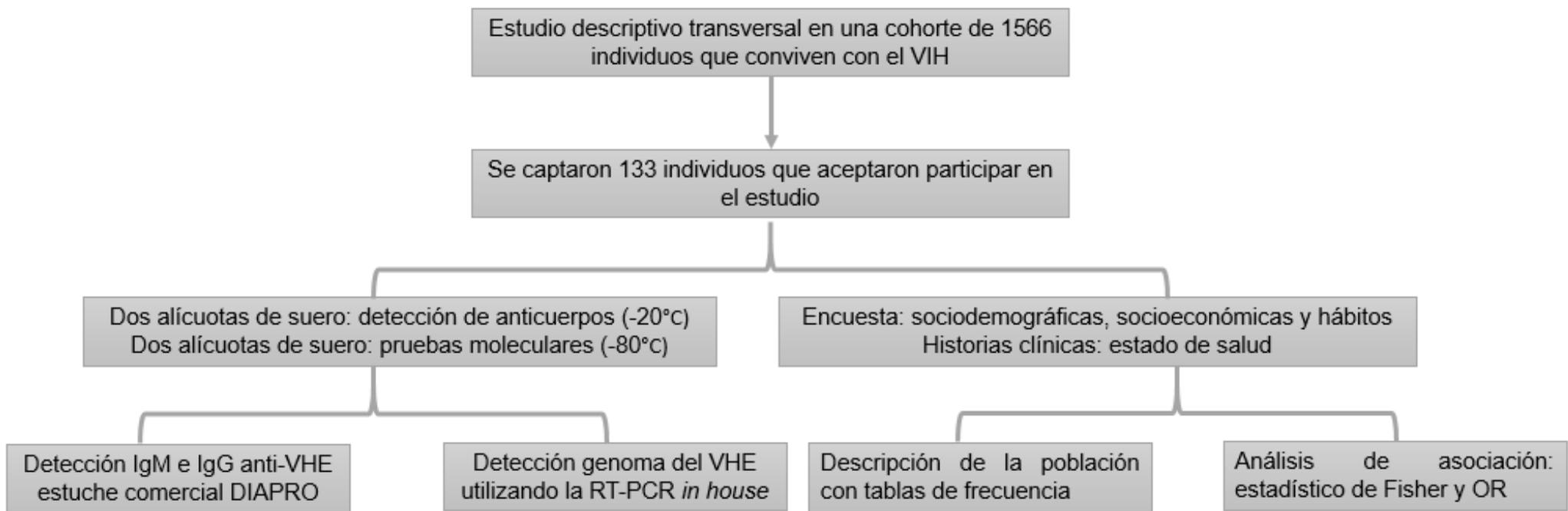


Figura 3. Diagrama de flujo del diagnóstico serológico y molecular de los individuos del estudio.

6. Resultados

6.1 Descripción de las variables de los participantes del estudio.

Se realizó una caracterización de la población de estudio de acuerdo con las variables socioeconómicas, sociodemográficas y clínicas que tenían los individuos al momento del reclutamiento. Se incluyeron 133 individuos que conviven con el VIH que aceptaron participar en el estudio. La mayoría [(70,7% (94/133))] eran hombres y el 56,4% (75/133) tenían entre 20-49 años.

Con relación a las variables sociodemográficas, el 92,5% (123/133) de la población residía en zona urbana y el 83,5% (111/133) de los participantes tenían estudios básicos. Adicionalmente el 56,4% (75/133) se encontraban empleados al momento de ingresar al estudio (tabla 3).

En cuanto a las condiciones socioeconómicas y de hábitos higiénicos, el 91,7% (122/133) de los individuos contaban con sistema de acueducto, el 89,5% (119/133) tenían red de saneamiento. Además, el 92,5% (123/133) de los individuos afirmó lavar los alimentos para el consumo y el 98,5% (131/133) realizan un lavado de manos después de utilizar el baño (tabla 3).

En relación con la clasificación clínica de la infección por VIH que tenían los individuos al momento de ingresar al programa de atención integral, se encontró que el 54,9% (73/133) se clasificaban en el estadio C1-C3, el 34,6% (46/133) en el estadio A1-A3 y el 10,5% (14/133) en los estadios B1-B3. El 89,5% (119/133) de los individuos no había tenido un diagnóstico de hepatitis viral previo o actual y el 92,5% (123/133) se encontraban vacunados contra la Hepatitis B (tabla 4).

Adicionalmente, el 43,6% (58/133) de los individuos tenían recuentos de células T CD4⁺ entre 200-499 células/mm³, el 48,1% (64/133) tenían >500 células/mm³ y el 8,3% (11/133) tenían recuentos <200 células/mm³.

De otro lado, se encontró que el 94% (125/133) de los individuos tenían valores de ALT entre 5,1-55 U/L (valor mínimo vs máximo: 7 U/L y 236 U/L) y el 86,5% (115/133) de AST entre 5,0-34 U/L (valor mínimo vs máximo: 11,1 U/L y 95 U/L), valores considerados para ambas pruebas dentro del intervalo de referencia.

El 98,5% (131/133) de la población de estudio se encontraba bajo tratamiento antirretroviral, y el 85,7% (114/133) de los individuos tenían carga viral indetectable (tabla 4).

Tabla 3. Variables socioeconómicas, sociodemográficas y hábitos de los individuos que participaron en el estudio.

Variable	n (%)
Total	133
Sociodemográficas	
Edad (años)	
20-49	75 (56,4)
50-80	58 (43,6)
Sexo	
Femenino	39 (29,3)
Masculino	94 (70,7)
Grado de escolaridad	
Superior	20 (15,0)
Primaria/secundaria	111 (83,5)
Ninguno	2 (1,50)
Zona de residencia	
Urbana	123 (92,5)
Rural	10 (7,5)
Tiempo en lugar de residencia	
<10 años	36 (27,1)

	>10 años	97 (72,9)
Ocupación		
	Desempleado	57 (42,9)
	Empleado	75 (56,4)
	Sin dato	1 (0,7)
Socioeconómicas y de hábitos higiénicos		
Sistema de acueducto		
	Sí	122 (91,7)
	No	10 (7,5)
	Sin dato	1 (0,8)
Agua hervida para el consumo		
	Sí	27 (20,3)
	No	106 (79,7)
Lavado de alimentos para el consumo		
	Sí	123 (92,5)
	No	10 (7,5)
Lavado manos		
	Sí	131 (98,5)
	No	2 (1,5)
Red de saneamiento		
	Con alcantarillado	119 (89,5)
	Sin alcantarillado	11 (8,3)
	Sin dato	3 (2,2)
Relación con animales		
	Sí	76 (57,1)
	No	57 (41,3)

Tabla 4. Variables clínicas de los individuos que participaron en el estudio.

Variable	n (%)
Total	133
Estado clínico	
A1 a A3	46 (34,6)
B1 a B3	14 (10,5)
C1 a C3	73 (54,9)
Células T CD4 (células/mm³)	
≥500	64 (48,1)
200-499	58 (43,6)
<200	11 (8,3)
Carga viral VIH (Número de copias/ml del ARN viral)	
Indetectable*	114 (85,7)
Detectable**	19 (14,3)
Vacuna Hepatitis B	
Si	123 (92,5)
No	10 (7,5)
Diagnóstico previo o actual hepatitis	
Si	14 (10,5)
No	119 (89,5)
Tratamiento antirretroviral	
Si	131 (98,5)
No	2 (1,5)
ALT (alanina aminotransferasa U/L)	
Valor normal (5,1-55)	125 (94,0)
Valor alto (>55)	8 (6,0)
AST (aspartato aminotransferasa U/L)	
Valor normal (5,0-34)	115 (86,5)
Valor alto (>34)	18 (13,5)
Fosfatasa alcalina (U/L)	
Valor normal (40-150)	36 (27,1)
Valor alto (>150)	84 (63,2)
Sin dato	13 (9,8)

*Indetectable: <40 copias/ml de ARN viral

**Detectable: >40 copias/ml de ARN viral

6.2 Frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgM anti-VHE y descripción de sus características.

La frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgM fue de 5,3% (7/133). El 71% (5/7) de estos individuos eran hombres y el 57,1% (4/7) tenían entre 20-49 años. Todos los individuos residían en zona urbana y contaban con sistema de acueducto y red de saneamiento, además, lavaban los alimentos para el consumo y realizaban un lavado de manos luego de utilizar el baño.

En cuanto a sus condiciones clínicas, el 57,1% (4/7) de los individuos estaban clasificados en los estadios A1-A3 de la infección por VIH al momento de ingresar al programa y de acuerdo al último resultado de sus recuentos de células T CD4⁺, todos ellos tenían recuentos mayores a 200 células/mm³. Adicionalmente, en su historial de coinfección, un individuo tenía diagnóstico previo de Hepatitis B y otro no tenía la vacuna contra la hepatitis B. Todos los individuos tenían pruebas de función hepática con valores dentro del rango de referencia, con valores mínimos y máximos para ALT de 15 U/L y 38 U/L y AST de 15,8 U/L y 304 U/L. En la tabla 5 y 6 se describen las variables socioeconómicas, sociodemográficas, de hábitos higiénicos y clínicas de los 7 individuos positivos para anticuerpos IgM.

Tabla 5. Variables socioeconómicas, sociodemográficas y hábitos de los individuos positivos para anticuerpos IgM anti-VHE.

Variable		n (%)
Total		7
Sociodemográficas		
Edad (años)		
	20-49	4 (57,1)
	50-80	3 (42,9)
Sexo		
	Femenino	2 (28,6)
	Masculino	5 (71,4)
Grado de escolaridad		
	Superior	2 (28,6)
	Primaria/secundaria	5 (71,4)
Zona de residencia		
	Urbana	7 (100)
Tiempo en lugar de residencia		
	<10 años	2 (28,6)
	>10 años	5 (71,4)
Ocupación		
	Desempleado	3 (42,9)
	Empleado	4 (57,1)
Socioeconómicas y hábitos higiénicos		
Sistema de acueducto		
	Sí	7 (100)
	No	0 (0,0)
Agua hervida para el consumo		
	Sí	0 (0,0)
	No	7 (100)
Lavado de alimentos para el consumo		
	Sí	6 (85,7)
	No	1 (14,3)
Lavado manos		
	Sí	7 (100)
	No	0 (0,0)
Red de saneamiento		
	Con alcantarillado	7 (100)
	Sin alcantarillado	0 (0,0)
Relación con animales		
	Sí	4 (57,1)
	No	3 (42,9)

Tabla 6. Variables clínicas de los individuos con anticuerpos IgM anti VHE.

Variable	n (%)
Total	7
Estadio clínico	
A1 a A3	4 (57,1)
B1 a B3	1 (14,3)
C1 a C3	2 (28,6)
Células T CD4⁺ (células/mm³)	
≥500	5 (48,1)
200-499	2 (43,6)
<200	0 (0,0)
Carga viral VIH (Número de copias/ml del ARN viral)	
Indetectable*	7 (100)
Detectable**	0 (0,0)
Vacuna Hepatitis B	
Sí	6 (85,7)
No	1 (14,3)
Diagnóstico previo o actual hepatitis	
Sí	1 (14,3)
No	6 (85,7)
Tratamiento antirretroviral	
Sí	7 (100)
No	0 (0,0)
ALT (alanina aminotransferasa U/L)	
Valor normal (5,1-55)	7 (100)
Valor alto (>55)	0 (0,0)
AST (aspartato aminotransferasa U/L)	
Valor normal (5,0-34)	7 (100)
Valor alto (>34)	0 (0,0)
Fosfatasa alcalina (U/L)	
Valor normal (40-150)	7 (100)
Valor alto (>150)	0 (0,0)

*Indetectable: <40 copias/ml de ARN viral

**Detectable: >40 copias/ml de ARN viral

6.3. Frecuencia de individuos que conviven con el VIH con anticuerpos IgG anti-VHE y descripción de sus características.

La frecuencia de individuos que conviven con el VIH que tenían anticuerpos IgG fue del 15% (20/133), de estos 20 individuos, 6 tenían anticuerpos IgM anti-VHE al mismo tiempo.

El 75% (15/20) de estos individuos eran hombres y el 55% (11/20) tenían entre 20-49 años. El 90% (18/20) de éstos, residían en zona urbana y tenían sistema de acueducto, mientras que el 80% (16/20) tenían red de saneamiento. De otro lado, el 95% (19/20) de los individuos lavaban los alimentos para el consumo y realizaban un lavado de manos después de utilizar el baño.

En cuanto a las variables clínicas, el 90% (18/20) tenían recuentos de células T CD4⁺ >200 células/mm³ y el 10% (2/20) tenían recuentos <200 células/mm³. Adicionalmente, el 90% (18/20) tenían una carga viral para VIH indetectable y el 95% (19/29) tenían pruebas de función hepáticas con valores mínimos y máximos de ALT de 14,0 U/L y 47 U/L y AST de 11,2 U/L y 30,4 U/L, cifras dentro del rango de referencia. En la tabla 7 se describen las variables de los individuos positivos para IgG anti-VHE.

6.4 Análisis de asociación entre las variables sociodemográficas, socioeconómicas, de hábitos higiénicos y clínicas y la frecuencia de individuos con anticuerpos IgG anti-VHE.

En el análisis bivariado entre las variables sociodemográficas, socioeconómicas, de hábitos higiénicos y clínicas y la frecuencia de individuos con anticuerpos IgG anti-VHE, se encontró una asociación significativa entre estar en un estadio de C1-C3 de la infección por VIH y la presencia de anticuerpos IgG ($p=0,040$). No se encontraron asociaciones significativas con las demás variables evaluadas. Sin embargo, es interesante resaltar que el valor p de la variable red de saneamiento presentó un valor cerca a la significancia estadística ($p=0,066$). En la tabla 7 se muestran los resultados del análisis bivariado con la prueba exacta de Fisher.

En el análisis multivariado, en la cual se realizó una regresión logística, encontramos que los individuos sin alcantarillado tenían mayor probabilidad de tener anticuerpos IgG contra el VHE [OR: 128 (IC 95%: 3,1-5358,6)].

De igual manera se encontró que los individuos con un estadio clínico C1-C3 al momento de ingresar al programa, tenían una menor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE [OR: 0,032 (IC 95%: 0,001-0,862)]. En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis multivariado (cálculo de OR).

Tabla 7. Resultados del análisis bivariado con la prueba exacta de Fisher

Variable	Total	Ac IgG VHE -	Ac IgG VHE +	Valor p*
Total	133	113	20	
Sociodemográficas				
Edad (años)				
20-49	75	64 (56,6)	11 (55,0)	1,00
50-80	58	49 (43,3)	9 (45,0)	
Sexo (n=133)				
Femenino	39	34 (87,2)	5 (12,8)	0,79
Masculino	94	79 (84,0)	15 (16,0)	
Grado de escolaridad				
Superior	20	15 (75,0)	5 (25,0)	
Primaria/secundaria	111	96 (86,5)	15 (13,5)	0,19
Ninguno	2	2 (100,0)	0 (0,0)	1,00
Zona de residencia				
Urbana	123	105 (85,4)	18 (14,6)	0,65
Rural	10	8 (80,0)	2 (20,0)	
Tiempo en lugar de residencia				
<10 años	36	32 (88,9)	4 (11,1)	0,59
>10 años	97	81 (83,5)	16 (16,5)	
Ocupación				
Desempleado	57	49 (86,0)	8 (14,0)	1,00
Empleado	75	64 (85,3)	11 (14,7)	
Sin dato	1	0	1	
Socioeconómicas y hábitos higiénicos				
Sistema de acueducto				
Sí	122	104 (85,2)	18 (14,8)	0,65
No	10	8 (80,0)	2 (20,0)	
Sin dato	1	1	0	
Agua hervida para el consumo				
Sí	27	23 (85,2)	4 (14,8)	1,00
No	106	90 (84,9)	16 (15,1)	

Lavado de alimentos para el consumo				
Sí	123	104 (84,6)	19 (15,4)	1,00
No	10	9 (90,0)	1 (10,0)	
Lavado manos				
Sí	131	112 (85,5)	19 (14,5)	0,28
No	2	1 (50,0)	1 (50,0)	
Red de saneamiento				
Con alcantarillado	119	103 (86,6)	16 (13,4)	0,066
Sin alcantarillado	11	7 (63,6)	4 (36,4)	
Sin dato	3	3	0	
Relación con animales				
Sí	76	62 (81,6)	14 (18,4)	0,23
No	57	51 (92,7)	4 (7,3)	
Clínicas				
Estado clínico				
A1 a A3	46	35 (76,1)	11 (23,9)	
B1 a B3	14	12 (85,7)	2 (14,3)	0,71
C1 a C3	73	66 (90,4)	7 (9,6)	0,04
Número total LTCD4 (células/mm ³)				
≥500	64	54 (84,4)	10 (15,6)	
200-499	58	50 (86,2)	8 (13,8)	0,80
<200	11	9 (81,8)	2 (18,2)	1,00
Carga viral VIH (Número de copias/ml del ARN viral)				
Indetectable**	114	97 (85,1)	18 (14,9)	1,00
Detectable***	19	16 (84,2)	2 (15,8)	
Vacuna Hepatitis B				
Sí	123	105 (85,4)	18 (14,6)	0,65
No	10	8 (80,0)	2 (20,0)	
Diagnóstico previo o actual hepatitis				
Sí	14	11 (78,6)	3 (21,4)	0,81
No	119	102 (85,7)	17 (14,3)	
Tratamiento antirretroviral				
Sí	131	111 (84,7)	20 (15,3)	1,00
No	2	2 (100,0)	0 (0,0)	
ALT (alanina aminotransferasa U/L)				

Valor Normal (5,1-55)	125	106 (84,8)	19 (15,2)	1,00
Valor alto (>55)	8	7 (87,5)	1 (12,5)	
AST (aspartato aminotransferasa U/L)				
Valor Normal (5,0-34)	115	96 (83,5)	19 (16,5)	0,31
Valor alto (>34)	18	17 (94,4)	1 (5,6)	
Fosfatasa alcalina (U/L)				
Valor Normal (40-150)	36	32 (88,9)	4 (11,1)	0,42
Valor alto (>150)	84	69 (82,1)	15 (17,9)	
Sin dato	13	12 (92,3)	1 (7,7)	

*Los datos fueron analizados utilizando una prueba exacta de Fisher, valor significativo $p < 0,05$

**Indetectable: <40 copias/ml de ARN viral

***Detectable: >40 copias/ml de ARN viral

Tabla 8. Resultados del análisis de asociación multivariado (cálculo de OR).

Variable	Total	Ac IgG VHE -	Ac IgG VHE +	OR (IC-95%) Regresión multivariada*
Total	133	113	20	
Sociodemográficas				
Edad (años)				
20-49	75	64 (56,6)	11 (55,0)	1
50-80	58	49 (43,3)	9 (45,0)	3,63 (0,18-74,0)
Sexo (n=133)				
Femenino	39	34 (87,2)	5 (12,8)	1
Masculino	94	79 (84,0)	15 (16,0)	1,54 (0,03-92,71)
Grado de escolaridad				
Superior	20	15 (75,0)	5 (25,0)	1
Primaria/secundaria	111	96 (86,5)	15 (13,5)	0,68(0,08-6,05)
Ninguno	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0,00
Zona de residencia				
Urbana	123	105 (85,4)	18 (14,6)	1
Rural	10	8 (80,0)	2 (20,0)	0,35 (0,002-52,44)
Tiempo en lugar de residencia				
<10 años	36	32 (88,9)	4 (11,1)	1
>10 años	97	81 (83,5)	16 (16,5)	3,21 (0,11-96,38)
Ocupación				
Desempleado	57	49 (86,0)	8 (14,0)	1
Empleado	75	64 (85,3)	11 (14,7)	0,34 (0,01-8,34)
Sin dato	1	0	1	
Socioeconómicas y hábitos higiénicos				
Sistema de acueducto				
Sí	122	104 (85,2)	18 (14,8)	1
No	10	8 (80,0)	2 (20,0)	4,18 (0,08-208,14)
Sin dato	1	1	0	
Agua hervida para el consumo				
Sí	27	23 (85,2)	4 (14,8)	
No	106	90 (84,9)	16 (15,1)	

Lavado de alimentos para el consumo				
Sí	123	104 (84,6)	19 (15,4)	1
No	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0,00
Lavado manos				
Sí	131	112 (85,5)	19 (14,5)	
No	2	1 (50,0)	1 (50,0)	
Red de saneamiento				
Con alcantarillado	119	103 (86,6)	16 (13,4)	1
Sin alcantarillado	11	7 (63,6)	4 (36,4)	128,1 (3,0-5358,5)
Sin dato	3	3	0	
Relación con animales				
Sí	76	62 (81,6)	14 (18,4)	
No	57	51 (92,7)	4 (7,3)	
Clínicas				
Estado clínico				
A1 a A3	46	35 (76,1)	11 (23,9)	1
B1 a B3	14	12 (85,7)	2 (14,3)	0,61 (0,11-4,33)
C1 a C3	73	66 (90,4)	7 (9,6)	0,03 (0,001-0,86)
Número total LTCD4 (células/mm ³)				
≥500	64	54 (84,4)	10 (15,6)	1
200-499	58	50 (86,2)	8 (13,8)	0,61 (0,11-3,27)
<200	11	9 (81,8)	2 (18,2)	3,03 (0,04-209,55)
Carga viral VIH (Número de copias/ml del ARN viral)				
Indetectable**	114	97 (85,1)	18 (14,9)	1
Detectable***	19	16 (84,2)	2 (15,8)	1,30 (0,03-61,31)
Vacuna Hepatitis B				
Sí	123	105 (85,4)	18 (14,6)	1
No	10	8 (80,0)	2 (20,0)	0,25 (0,007-8,67)
Diagnóstico previo o actual hepatitis				
Sí	14	11 (78,6)	3 (21,4)	1
No	119	102 (85,7)	17 (14,3)	1,91 (0,19-19,63)
Tratamiento antirretroviral				
Sí	131	111 (84,7)	20 (15,3)	1
No	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0,00
ALT (alanina aminotransferasa U/L)				

Valor Normal (5,1-55)	125	106 (84,8)	19 (15,2)
Valor alto (>55)	8	7 (87,5)	1 (12,5)
AST (aspartato aminotransferasa U/L)			
Valor Normal (5,0-34)	115	96 (83,5)	19 (16,5)
Valor alto (>34)	18	17 (94,4)	1 (5,6)
Fosfatasa alcalina (U/L)			
Valor Normal (40-150)	36	32 (88,9)	4 (11,1)
Valor alto (>150)	84	69 (82,1)	15 (17,9)
Sin dato	13	12 (92,3)	1 (7,7)

*La primera categoría de cada variable corresponde a la categoría referencia para el cálculo de OR.

**Indetectable: <40 copias/ml de ARN viral

***Detectable: >40 copias/ml de ARN

6.5 Estandarización de la RT-PCR multiplex para la detección del VHE y la RNAsa-P.

En el proceso de estandarización de la RT-PCR multiplex se realizaron curvas estándar para determinar la eficiencia y sensibilidad de amplificación, utilizando una copia de ADN complementario (ADNc) sintetizado a partir de ARN del VHE. En la figura 4 se observan los resultados representativos de la dilución seriada de cDNA del VHE.

La eficiencia del ensayo se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar. La curva estándar generada a partir de los datos de la RT-PCR dieron como resultado una eficiencia de reacción de 104% en el ensayo multiplex para la detección del ADNc del VHE (figura 4B), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,97, indicando que la fuerza y dirección de la regresión lineal es proporcional entre los valores de Ct y la concentración del ADNc. Para la interpretación del R^2 , se consideró como criterio de calidad un valor menor a 0,999, el cual se obtuvo en los ensayos, proporcionando un buen nivel de confianza en los datos. La eficiencia depende de varias condiciones del ensayo como el rendimiento del mastermix y la calidad de la muestra, generalmente se considera aceptable entre el 90 y 110%. Según la eficiencia obtenida en el ensayo multiplex para el gen ORF3 del VHE, esta se encuentra dentro del rango para ser considerada una buena eficiencia de la reacción.

La sensibilidad de detección del ensayo de RT-PCR se determinó a partir de diluciones seriadas (1:10,1:100,1:1000,1:10,000 y 1:100,000) de una concentración conocida de ADNc del VHE (15,850 ng/ μ L). Los resultados se informaron como números de ciclos frente a concentración de ADNc logarítmica. Se encontró una

relación inversamente proporcional entre el Ct y las concentraciones utilizadas, es decir a menor concentración del ADNc, mayor el valor del Ct. Adicionalmente, el ADNc pudo ser detectado hasta la dilución 1:1000 (figura 4A).

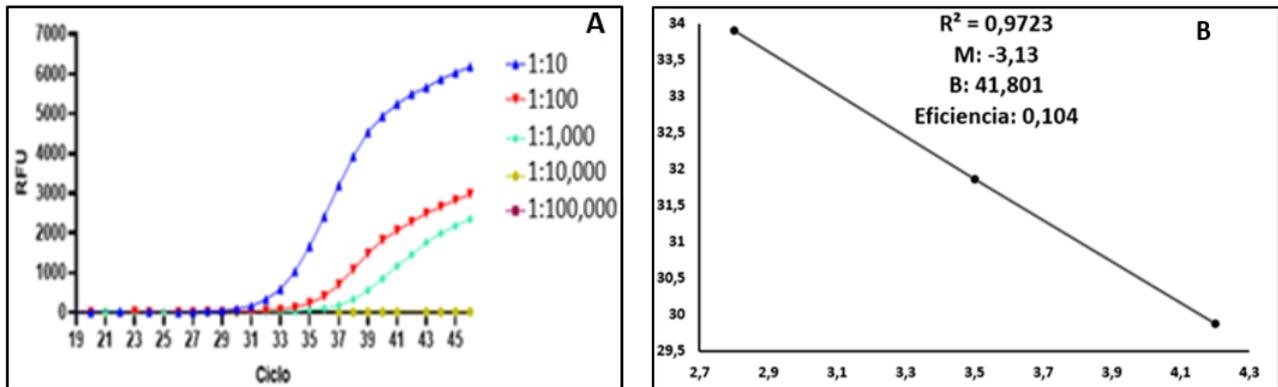


Figura 4. Resultados representativos de la dilución seriada de ADNc del VHE. A. Niveles de fluorescencia para cada Ct. En el eje Y se encuentran las Unidades de Fluorescencia Relativa y en el eje X los valores de cada Ct **B.** Curva estándar utilizada para el cálculo de la eficiencia. En el eje Y se representan los Ct y en el X el log de las concentraciones del ADNc

Durante este proceso de estandarización también se realizaron reacciones monoplex para cada gen y estas fueron comparadas con reacciones multiplex, para determinar el delta ct (ΔCt), que no debe tener más de un ciclo de diferencia para validar la detección de los genes en la RT-PCR multiplex. En los valores obtenidos de Δct se obtuvo una diferencia menor e igual a 1, validando así la detección de los genes de interés por medio de nuestra técnica. En la figura 5 se esquematizan las curvas de detección para el gen RNAsa P en reacción monoplex (figura 5A) y multiplex (figura 5B) y el gen ORF3 del VHE en reacción monoplex (figura 5C) y multiplex (figura 5D).

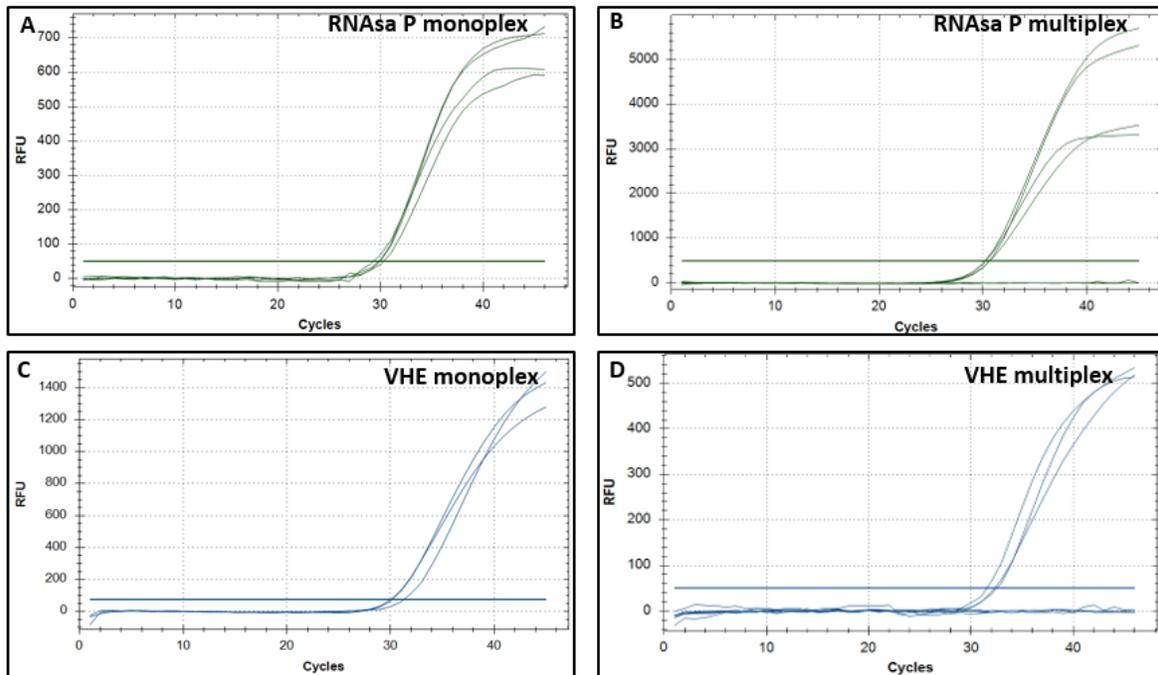


Figura 5. Curvas de detección en reacciones monoplex y multiplex. **A.** Curva de detección para la RNAsa P en monoplex. **B** Curva de detección para la RNAsa P en multiplex. **C.** Curva de detección para el ORF3 del VHE en monoplex. **D.** Curva de detección para el ORF3 del VHE en multiplex. En el eje Y se encuentran las Unidades de fluorescencia relativa y en el eje X los valores de cada Ct, cada curva es representada por un color que diferencia a cada dilución.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de tres reacciones monoplex y multiplex para el gen de la RNAsa P con un valor promedio para los ct de 30,34 y 29,85, respectivamente. Así mismo, para la detección del gen ORF3 del VHE, con un valor promedio de los ct de 30,48 para las reacciones monoplex y 31,38 para la reacción multiplex. Se puede observar que tanto en los ensayos monoplex, como en los multiplex se obtiene amplificación de ambos genes y su delta ct no difiere en más de una unidad (el delta Ct se obtuvo hallando la diferencia entre los Ct de cada reacción).

Tabla 9. Valores de Ct y delta (Δ) ct en reacciones multiplex y monoplex para la RNAsa P y el ORF3 del VHE.

Gen	Multiplex(Ct)	Monoplex(Ct)	ΔCt
RNAsa P-reacción 1	30,62	30,26	0,36
RNAsa P-reacción 2	30,17	29,81	0,36
RNAsa P-reacción 3	30,23	29,48	0,75
VHE-reacción 1	31,00	30,17	0,83
VHE-reacción 2	31,10	30,00	1,00
VHE-reacción 3	32,04	31,27	0,77

6.6. Detección del VHE, a través de la amplificación del ORF3

Previo a la realización de la prueba de RT-PCR se extrajo el ARN de las muestras de suero de los participantes del estudio. Para su utilización en la RT-PCR éste debe estar libre de ADN y nucleasas para el paso inicial a ADNc del ARN de interés, a través de la acción de la enzima transcriptasa inversa o retro transcriptasa (RT) del kit one-step utilizado.

Se obtuvo un promedio de concentración del ARN extraído de las 133 muestras de [20,22 ng/ μ l (mínima de 0,5 ng/ μ l y máxima de 91,0 ng/ μ l)].

Se realizó la técnica de RT-PCR *in house* estandarizada para la amplificación de una secuencia del ORF3 del VHE y de la RNAsa P en las 133 muestras de suero de los individuos incluidos. La RNAsa P fue detectada en 128 individuos y teniendo

en cuenta que la detección de este gen constituye el control interno de la prueba, estos individuos fueron considerados para los análisis. Vale la pena mencionar que, los cinco individuos que fueron negativos para la RNAsa P, también fueron negativos para la secuencia del ORF3 del VHE.

En el 2,3% (3/128) de los individuos se detectó el genoma del VHE por medio de la amplificación de una secuencia del ORF3. En la figura 6 se observan las curvas de amplificación para los genes de la RNAsa P y el ORF3 del VHE de los 3 individuos.

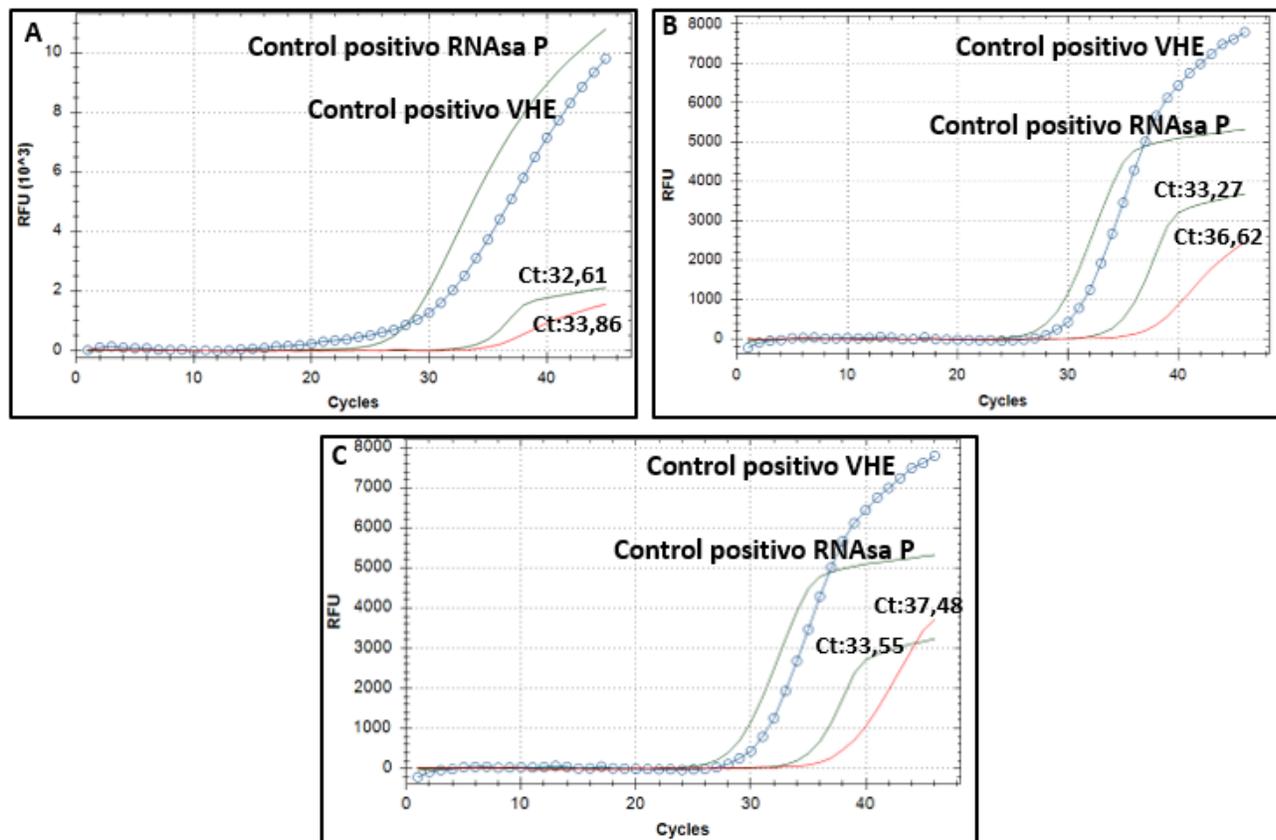


Figura 6. Curvas de amplificación para las muestras positivas por RT-PCR para la detección del ARN del gen ORF3 del VHE y de la RNAsa P. A. Amplificación para el paciente 1. **B.** Amplificación para el paciente 2. **C.** Amplificación para el paciente 3. Las curvas color rojo identifican la amplificación para el ORF3 del VHE y las de color verde para la RNAsa P. los controles positivos se representan en color verde para la RNAsa P y azul para el ORF3 del VHE. En el eje Y se encuentran las Unidades de fluorescencia relativa y en el eje X los valores de cada ct para cada curva

Entre los individuos a los cuales se les detectó el genoma del VHE, dos individuos eran hombres y una mujer, con 47, 60 y 54 años, respectivamente. Los tres individuos han residido en el área urbana y contaban con servicios de acueducto y red de saneamiento, manifestaron lavar los alimentos para el consumo y lavarse las manos después de utilizar el baño (tabla 10).

Todos los individuos tenían recuentos de células T CD4⁺ >500 células/mm³, con carga viral para VIH indetectable, estaban vacunados contra la Hepatitis B y no tenían historia de infección por otras hepatitis virales. Un individuo tenía anticuerpos IgM e IgG anti-VHE (tabla 10).

Tabla 10. Variables socioeconómicas, sociodemográficas, hábitos y clínicas de los individuos positivos para la amplificación del ORF3 del VHE.

Variable	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3
Edad (años)	47	54	60
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino
Grado de escolaridad	Primaria	Primaria	Secundaria
Zona de residencia	Urbana	Urbana	Urbana
Tiempo en lugar de residencia	Siempre	Siempre	Siempre
Ocupación	Mensajero	Ama de casa	Cotero
Sistema de acueducto	Si	Si	Si
Agua hervida para el consumo	No	No	Si
Lavado de alimentos	Si	Si	Si
Lavado de manos	Si	Si	Si
Red de saneamiento	Alcantarillado	Alcantarillado	Alcantarillado
Relación con animales	No	Si	Si
Estadio clínico	C3	B2	A3
Número total LTCD4	548	715	708
Carga viral para VIH	Indetectable	Indetectable	Indetectable
Vacuna Hepatitis B	Si	Si	Si
Diagnóstico hepatitis	No	No	No
Tratamiento antirretroviral	Si	Si	Si
IgM anti-VHE	Negativo	Positivo	Negativo
IgG anti-VHE	Negativo	Positivo	Negativo

7. Discusión

Las investigaciones recientes sobre el VHE son de gran importancia para la comprensión del curso y epidemiología de la infección por este virus. De hecho, ahora se considera un patógeno emergente de importancia creciente en los sistemas de salud, debido a que la hepatitis E paso de ser una enfermedad autolimitada entérica a una enfermedad multifactorial, multiriesgo, que en algunas poblaciones podría ser eventualmente crónica¹¹⁷. La infección crónica se ha visto asociada a individuos inmunosuprimidos como los individuos que conviven con el VIH; sin embargo, la epidemiología, los factores de riesgo y las complicaciones a largo plazo de la infección por el VHE en estos individuos, son menos conocidas que en la población general¹¹⁸. Se han descrito factores que afectan la prevalencia de la infección como el área geográfica, hábitos, estilos de vida, e inmunosupresión grave definida por una disminución de las células T CD4⁺ <100-200 células/mm³²³.

En la población de individuos que conviven con el VIH se han observado seroprevalencias del VHE superiores al 40% en regiones de África y Asia, del 10 al 20% en países de Europa, menos del 10% en Oceanía³¹ y en América se alcanzan cifras hasta un 19,5%³⁵. Estas discrepancias pueden, en parte, reflejar diferentes características regionales como sociodemográficas, socioeconómicas y clínicas que pueden comportarse como factores de riesgo para contraer la infección por el VHE. Además, el desempeño de las pruebas serológicas empleadas puede variar de un ensayo a otro, teniendo en cuenta las limitaciones relacionadas con sensibilidad y especificidad de los estuches de ELISA¹¹⁹. Los primeros estuches comerciales mostraron una variedad de falsos positivos; sin embargo, los nuevos estuches

comerciales como el utilizado en nuestro estudio (Dia.pro), han demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra el VHE del 98% y 100%, respectivamente. Otros estuches comerciales que también han sido utilizados han mostrado sensibilidad variable como: Mikrogen, Diagnostic MP y Autoimmune con sensibilidades del 72,5%, 73,3% y 57,5%, respectivamente; destacando, que los estuches comerciales no siempre reflejan una sensibilidad del 100%, por lo cual los niveles bajos de anticuerpos podrían no ser detectado¹²⁰.

Nuestros hallazgos revelan que el 15% y 5% de los individuos que conviven con el VIH presentan anticuerpos IgG e IgM anti-VHE, respectivamente, resultados comparables con los obtenidos en otros estudios de América; por ejemplo, se han reportado seroprevalencias de anticuerpos IgG anti-VHE en Estados Unidos de 6,7%-19,5%^{35,106}, Argentina 6,7-7,3%^{36,107} y Brasil 4,1-7,1 y 10,7%^{37,38,108}, estas cifras han ido aumentando en los estudios más recientes, lo cual podría explicarse por una mejora en la sensibilidad de las pruebas inmunológicas utilizadas para la detección de anticuerpos.

Algunas características clínicas se han asociado con la infección por el VHE en individuos que conviven con el VIH, entre ellas, el tener recuentos de células T CD4⁺ <200 células/mm³, sin embargo, esta asociación ha sido controvertida pues algunos estudios no muestran diferencias entre las cifras de seroprevalencia y los recuentos de células T CD4⁺ ^{27,30,37,38,108,121}, mientras que otros estudios reportan que, los recuentos de células T CD4⁺ <200 células/mm³ se asocian con la presencia de anticuerpos anti-VHE y en algunos casos constituye un mayor riesgo de tener la infección por el VHE^{104,105,107}. En nuestros resultados, no se encontró una

asociación estadísticamente significativa entre los recuentos de células T CD4⁺ y la presencia de anticuerpos IgG anti-VHE, esto probablemente se debe a que todos los individuos estaban en terapia antirretroviral y la mayoría (90%) tenían una carga viral indetectable para VIH (menor a 40 copias de ARN/ml) y valores de células TCD4⁺ >200 células/mm³.

Se ha descrito que la falta de medidas higiénicas como la ausencia de lavado de manos o de una red de saneamiento constituyen un factor de riesgo importante para la transmisión del VHE¹²². En nuestros análisis encontramos que los individuos que no contaban con red de saneamiento tenían una probabilidad mayor de presentar anticuerpos IgG contra el VHE (OR: 128; IC 95%: 3,1-5359); consistente con lo encontrado en estudios de África ($p < 0,001$)¹²³ y Brasil ($p < 0,05$)³⁸. Si bien se han determinado otros factores asociados a la infección como el bajo nivel socioeconómico, el consumo de carne de cerdo, edad avanzada y el género masculino, en nuestros resultados no encontramos asociación con estas variables, esto probablemente pudo deberse al bajo número de individuos del estudio y a que el 90% de los individuos con anticuerpos anti-VHE residía en la ciudad de Medellín o en el área metropolitana, sitios que cuentan con sistema de acueducto y red de saneamiento. Por otro lado, en nuestro estudio no se tuvieron en cuenta variables que se han asociado a la infección por el VHE como son el alto consumo de carne de cerdo, la ingesta de alcohol y el contacto persona a persona; siendo este último, un factor de riesgo recientemente reportado y asociado con la propagación del VHE, como el contacto sexual, particularmente en hombres que tienen sexo con hombres^{124,125,126} y otras prácticas sexuales como las orales-anales y digitales-

anales que pueden facilitar la transmisión de patógenos por vía fecal-oral como el VHE¹²⁷.

En nuestro estudio se encontró una asociación significativa entre estar en un estadio C1-C3 de la infección por VIH y la presencia de anticuerpos IgG anti-VHE ($p=0,040$). Adicionalmente, encontramos que los individuos con un estadio clínico C1-C3 tenían una menor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE [OR: 0,032 (IC 95%: 0,001-0,862)], esto podría explicarse por una pérdida de la función inmune en los individuos con la infección por VIH, dado que en esta infección se han observado (i) un número reducido de células B de memoria¹²⁸, (ii) alteraciones en el cambio de isotipo de IgM a IgG, las cuales se generan por la acción de la proteína Nef del VIH que mimetiza la activación de las células B interfiriendo con la señalización mediada por CD40L, un factor importante para que se de este cambio de isotipo¹²⁸ y (iii) por alteraciones funcionales de las células T CD4⁺ como consecuencia de anomalías generadas durante la infección por VIH, por ejemplo, se presenta una disminución de la polifuncionalidad y producción de IL-2 que desencadena un disminución en la proliferación de estas células, una sobrerregulación de moléculas inhibitorias como el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el ligando 1 de muerte programada (PD-1) que por medio de diversos mecanismos evitan que el linfocito T se vuelva efector, un aumento en la expresión de marcadores de apoptosis y reducción en la señalización de las células T¹²⁹.

Con el objetivo de estandarizar una técnica molecular eficiente para la detección del genoma del VHE, utilizamos el protocolo de Jothikumar¹¹⁴ considerado uno de los que tiene mejor sensibilidad y especificidad para la detección del VHE con primers

dirigidos al ORF3¹³⁰. Utilizando este protocolo nosotros detectamos ARN del VHE en 2% (3/128) de los individuos que conviven con el VIH, esta frecuencia de coinfección VHI/VHE es consistente con lo reportado a nivel mundial. En algunos países como Brasil³⁷, Francia⁸⁰, Polonia¹³¹, Gabón¹³² y Estados Unidos¹³³, se encontró una variabilidad de la coinfección VHI/VHE que oscila entre el 0% y el 4%, variabilidad que depende (i) de las características de la población (sociodemográficas, socioeconómicas, hábitos higiénicos y clínicas), (ii) del uso de diversos protocolos con primers dirigidos a otras regiones del genoma como el ORF1^{35,96,117} u ORF2^{26,36,88,92,93} y (iii) a la alta diversidad entre genotipos que va desde 23,6% hasta 27,7% e intragenotípicas de 11,8%, 19,3% y 17,0%, para los genotipos VHE1, VHE3 y VHE4, respectivamente. La presencia de estas secuencias heterogéneas dificulta el diseño de primers sensibles para la detección de los 4 genotipos del virus; sin embargo, el conjunto de primers y sonda diseñados en el protocolo Jothikumar se ubican en una región altamente conservada del genoma¹³⁴.

Por otro lado, el tipo de muestra influye en la detección del ARN del virus, debido a que, la viremia en sangre empieza a desaparecer a la tercera semana y en heces esta permanece dos semanas más; no obstante, en nuestro estudio se consideró la detección del VHE en suero, debido a la disponibilidad de la muestra, pues el objetivo principal era determinar la frecuencia de individuos que tenían anticuerpos anti-VHE. Adicionalmente la presencia de inhibidores para la RT-PCR en materia fecal puede interferir con la detección del ARN del virus¹³⁵.

Dado el riesgo de desarrollar una infección crónica que podría evolucionar a fibrosis y cirrosis en individuos que conviven con el VIH, los estudios deberían realizar un seguimiento clínico con detección del ARN del VHE en esta población para corroborar la resolución de la enfermedad, pues además de esta presentación clínica, también se han descrito el desarrollo de manifestaciones extrahepáticas como el síndrome de Guillain-Barré, neuritis braquial bilateral, neuropatía periférica, encefalitis, trombocitopenia y pancreatitis²³. En consideración a lo anterior y dadas las limitaciones, en nuestro estudio no fue posible realizar un seguimiento de los 3 pacientes positivos para el ARN del VHE, ni los 7 que tenían anticuerpos IgM anti-VHE.

De los 7 individuos positivos para anticuerpos IgM anti-VHE, solo en uno de ellos pudo detectarse el ARN del VHE. Teniendo en cuenta que la presencia de la inmunoglobulina M refleja una infección reciente o aguda, se esperaba que en estos individuos se pudiera detectar el ARN viral; sin embargo, los resultados obtenidos pueden explicarse desde la cinética de la infección por el VHE, pues en la infección aguda la viremia es transitoria y desaparece en sangre a la tercera semana de la infección, justo antes que los anticuerpos alcancen su nivel máximo. Además, se debe tener en cuenta que la técnica utilizada no detecta niveles por debajo de 15.85 ng/ μ l de cDNA del virus, por lo cual se podría pensar que algunos individuos seropositivos tenían una carga viral baja y no pudo ser detectada con nuestro protocolo de RT-PCR. En los casos en los que hay poca cantidad de material genético, una PCR anidada resulta ser un método más sensible, ya que, en esta se emplean dos parejas de primers, una externa y otra interna a la primera; sin

embargo, requiere una mayor manipulación de las muestras, por lo cual, hay mayor riesgo de contaminación.

Por otro lado, dos de los tres individuos positivos para el ARN del VHE no tenían la presencia de marcadores inmunológicos (IgG e IgM anti-VHE) detectados por el estuche de ELISA, estos individuos podrían tener una infección aguda por el VHE donde aún no se ha producido la seroconversión y además es importante resaltar que en ellos la producción de anticuerpos podría estar afectada a pesar del tratamiento antirretroviral por (i) alteraciones funcionales de las células T CD4⁺ o (ii) la activación inmune crónica e inflamación características en una infección por VIH, que aunque es menor grado bajo tratamiento antirretroviral puede acelerar la proliferación y diferenciación de células T, lo que eventualmente agotaría la capacidad restauradora del sistema inmune¹³⁶.

Es importante resaltar que los individuos que presentaban la coinfección VIH/VHE eran mayores de 40 años y en su mayoría pertenecían al género masculino, esto es consistente con lo reportado en la literatura en estudios de seroprevalencia en los que se ha encontrado asociación con variables como la edad y el género masculino^{26,27,30,34,105,121,137}.

Para finalizar, una de las principales limitaciones del estudio fue debido a las condiciones presentadas en la pandemia y al traslado de los pacientes del programa a otra IPS, lo cual afectó el reclutamiento de los pacientes, logrando solo incluir 133 individuos, esta variable podría ser importante en los análisis (i) dado que no se encontraron asociaciones con diferentes factores de riesgo como se ha reportado

ampliamente, (ii) los intervalos de confianza (IC:95%) fueron muy amplios, (iii) se afecta la potencia estadística y (iv) sesgo en algunas posibles asociaciones.

8 Conclusiones

Los resultados del estudio nos permiten concluir:

- La frecuencia de individuos que conviven con el VIH que hacen parte del programa de atención integral en una IPS de la ciudad de Medellín, con anticuerpos IgG anti-VHE fue del 15% (20/133).
- La frecuencia de individuos que conviven con el VIH que hacen parte del programa de atención integral en una IPS de la ciudad de Medellín, con anticuerpos IgM anti-VHE fue del 5% (7/133).
- De los 128 individuos que conviven con el VIH de los cuales se obtuvo amplificación de la RNAsa P, el 2% estaban infectados con el VHE, identificado por la amplificación del ORF3 del VHE.
- De los tres individuos infectados con el VHE, solo uno tenía anticuerpos IgM e IgG anti-VHE simultáneamente.
- Se encontró una asociación significativa entre estar en un estadio de C1-C3 de la infección por VIH y la presencia de anticuerpos IgG ($p=0,040$).
- Los individuos sin red de saneamiento tenían un riesgo 128 veces mayor de tener anticuerpos IgG anti-VHE en comparación con los que tenían red de saneamiento [OR: 128 (IC 95%: 3,1-5358,6)].
- Los individuos con un estadio clínico C1-C3 tenían una menor probabilidad de tener anticuerpos IgG anti-VHE [OR: 0,032 (IC 95%: 0,001-0,862)].

9. Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados, las perspectivas se orientan a:

- Explorar por medio de secuenciación y análisis filogenético cual es el genotipo asociado con la infección en esta población, lo cual sería de gran importancia.
- Hacer un seguimiento a los individuos que fueron positivos para el genoma del VHE y así determinar si eran casos esporádicos o crónicos, información que serviría para el manejo y posible esquema de tratamiento en estos pacientes.
- Aunque no encontramos asociación con los recuentos de células T CD4⁺, se deberían realizar estudios de marcadores de infección (anti-HEV IgM/IgG y HEV ARN) en individuos con recuentos bajos de células T CD4⁺, pues se ha descrito como un factor de riesgo para la cronicidad de la infección.

10. Agradecimientos

Comité para el Desarrollo de la Investigación-CODI, Universidad de Antioquia

A los individuos que conviven con el VIH que participaron voluntariamente, gracias a ellos pudo llevarse a cabo el desarrollo del proyecto para cumplir con cada uno de los objetivos propuestos.

A las investigadoras principales Astrid Milena Bedoya y Ana Lucía Rodríguez Perea que fueron el pilar principal para el desarrollo del proyecto, gracias a su acompañamiento y rigurosidad en cada etapa del proceso se lograron obtener los resultados mostrados y enriquecieron mi proceso de aprendizaje.

A los miembros de mi comité tutorial, las Dra. Liliana Jazmín Acevedo Sáenz, Carolina Montoya Ruiz y el Dr. Armando Baena por sus aportes durante todo el desarrollo del trabajo, que ayudaron a consolidar los resultados y mi formación académica.

Al Dr. Juan Carlos Álzate por sus aportes para el desarrollo del proyecto y proporcionar ayuda esencial para obtener la población de estudio. A las Dras. Melissa Gutiérrez y Sofía Giraldo por su ayuda en la captación de los pacientes y en la recolección de la información.

A cada uno de los miembros del grupo de Biología Molecular y Celular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), por recibirme en su laboratorio, acogerme de una manera tan cálida, instruirme, acompañarme en todo momento y brindarme su valiosa amistad.

Al grupo de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia por proporcionarnos ARN del VHE para estandarizar la técnica de RT-PCR y realizar los ensayos de detección del genoma.

A la Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas por la formación brindada a todos sus estudiantes y el apoyo para resolver nuestras dificultades, en especial a la Dr Eliana Restrepo por su incondicionalidad para resolver dificultades.

A mi familia por vivir cada etapa de mi proceso como si fuera suya, por su apoyo incondicional, amor, confianza y fuerza, gracias por creer en mí siempre.

A mis amigos Alejandro Gómez, Natalia García, Alejandra Ruiz, Catalina Muñoz y Jonatán Gómez por estar en todo momento, sufrir conmigo en los momentos de mayor dificultad sin dejar de darme energía, confianza y alegría para seguir.

A Raúl Guevara, gracias por tanto amor, tanto apoyo, por acompañarme en los momentos más difíciles brindándome toda la fuerza y confianza para llegar hasta el final.

Y a todas las personas que de una u otra manera han hecho parte de mi formación como profesional y persona.

11. Bibliografía

1. WHO | Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. WHO. Published online 2019. Accessed October 13, 2020. <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>
2. Papatheodoridi M, Papatheodoridis G V. Is hepatitis delta underestimated? *Liver Int.* 2021;41(S1):38-44. doi:10.1111/LIV.14833
3. Jacobsen KH. Globalization and the Changing Epidemiology of Hepatitis A Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(10):1-12. doi:10.1101/cshperspect.a031716
4. Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernandez Escamez PS, et al. Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA J.* 2017;15(7): 1-89. doi:10.2903/j.efsa.2017.4886
5. Organización Mundial de la Salud. (2012). Prevención y control de las hepatitis virales: marco para la acción mundial. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/130014>
6. JM E. Light and Darkness: Prevalence of Hepatitis E Virus Infection among the General Population. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:1-15. doi:10.1155/2014/481016
7. Rodríguez-Frias F, Jardi R, Buti M. Hepatitis E: Molecular virology, epidemiology and pathogenesis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(10):624-634. doi:10.1016/j.eimc.2012.01.014
8. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in

developing countries. *Viruses*. 2016;8(9):1-20. doi:10.3390/v8090253

9. Kamar N, Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus: Chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(1):20-27. doi:10.1016/j.clinre.2014.07.005
10. Corman VM, Nagy P, Ostermann S, Arloth J, Liljander A, Barua R, et al. Hepatitis e virus genotype 7 rna and antibody kinetics in naturally infected dromedary Calves, United Arab Emirates. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(9):2214-2217. doi:10.3201/eid2609.191758
11. Geng Y, Zhang H, Huang W, Harrison TJ, Geng K, Li Z, et al. Persistent Hepatitis E Virus Genotype 4 Infection in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hepat Mon*. 2014;14(1):15618: 1-4. doi:10.5812/HEPATMON.15618
12. Neukam K, Barreiro P, Macías J, Avellón A, Cifuentes C, Martín-Carbonero L, et al. Chronic hepatitis E in HIV patients: rapid progression to cirrhosis and response to oral ribavirin. *Clin Infect Dis*. 2013;57(3):465-468. doi:10.1093/CID/CIT224
13. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J, et al. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J Clin Virol*. 2014;61(3):334-339. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.016
14. Campolmi I, Spinicci M, Mayaregua DR, Barahona HG, Mantella A, Lara Y, et al. Seroprevalence of hepatitis a virus, hepatitis e virus, and helicobacter pylori

in rural communities of the Bolivian Chaco, 2013. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(5):1275-1280. doi:10.4269/ajtmh.17-0747

15. Alvarado-Esquivel C, Sanchez-Anguiano LF, Hernandez-Tinoco J. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in general population in rural Durango, Mexico. *Hepat Mon.* 2014;14(6): 1-6. doi:10.5812/hepatmon.16876
16. Duque A, Restrepo L, Mantilla-Rojas, Toro M, Olarte JC, et al. Frecuencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis E en donantes de sangre del municipio de Yarumal, Antioquia. *Revista Colombiana De Gastroenterología*, 31(3), 229-234. <https://doi.org/10.22516/25007440.95>
17. Peláez D, Hoyos MC, Rendón JC, Mantilla C, Ospina MC, Cortés-Mancera F, et al. Infección por el virus de la hepatitis E en pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral en Colombia. *Biomedica.* 2014;34(3):354-365. doi:10.7705/biomedica.v34i3.2236
18. Peláez D, Martínez-Vargas D, Escalante-Mora M, Palacios-Vivero, et al. Infección simultánea por el virus de la hepatitis E y de otras hepatitis virales en Colombia y su caracterización genotípica. *Biomédica.* 2016; 36 (Suplemento 2), 69-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2957>
19. Betancur CA, Mejía MV, Portillo S. Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012. *Acta méd colomb.* 2013;38(2):68-70: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-

24482013000200006

20. Gutiérrez-Vergara CC, Rodríguez B, Parra-Suescún J, et al. Determinación de estudios totales (IgG/IgM) y específicos (IgM) para el virus de la hepatitis E y detección molecular del virus en heces de humanos con o sin exposición ocupacional a porcinos en 10 municipios de Antioquia. *Iatreia*. 2015; 28 (3): 248- 258. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n3a03>
21. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med*. 2012;367(13):1237-1244. doi:10.1056/NEJMra1204512
22. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2009;361(10):1025-1027. doi:10.1056/NEJMc0903778
23. Debes JD, Pisano MB, Lotto M, Re V. Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. *J Clin Virol*. 2016;80:102-106. doi:10.1016/j.jcv.2016.05.006
24. Singh A, Seth R, Gupta A, Shalimar, Nayak B, Acharya S kumar, et al. Chronic hepatitis E - an emerging disease in an immunocompromised host. *Gastroenterol Rep*. 2018;6(2):152-155. doi:10.1093/gastro/gow024
25. Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? *J Hepatol*. 2017;66(5):1082-1095. doi:10.1016/j.jhep.2016.11.016
26. Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, van Lunzen J, et al. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon.

J Clin Virol. 2013;58(1):18-23. doi:10.1016/J.JCV.2013.05.004

27. Pineda JA, Cifuentes C, Parr M, Merchante N, Pérez-Navarro E, Rivero-Juárez A, et al. Incidence and natural history of hepatitis e virus coinfection among HIV-infected patients. AIDS. 2014;28(13):1931-1937. doi:10.1097/QAD.0000000000000378
28. Riveiro-Barciela M, Buti M, Homs M, Campos-Varela I, Cantarell C, Crespo M, et al. Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. PLoS One. 2014;9(7):1-6. doi:10.1371/journal.pone.0103028
29. Mateos-Lindemann ML, Diez-Aguilar M, Galdamez ALG, Galán JC, Moreno A, Pérez-Gracia MT. Patients infected with HIV are at high-risk for hepatitis E virus infection in Spain. J Med Virol. 2014;86(1):71-74. doi:10.1002/jmv.23804
30. Rivero-Juarez A, Martinez-Dueñas L, Martinez-Peinado A, Camacho A, Cifuentes C, Gordon A, et al. High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. J Infect. 2015;70(6):624-630. doi:10.1016/J.JINF.2014.10.016
31. Rivero-Juarez A, Lopez-Lopez P, Frias M, Rivero A. Hepatitis e infection in HIV-infected patients. Front Microbiol. 2019;10:1425: 1-11. doi:10.3389/fmicb.2019.01425
32. Maylin S, Stephan R, Molina JM, Peraldi MN, Scieux C, Nicand E, et al. Prevalence of antibodies and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. J Clin Virol. 2012;53(4):346-349.

doi:10.1016/j.jcv.2012.01.001

33. Scotto G, Martinelli D, Centra M, Querques M, Vittorio F, Carri PD, et al. Epidemiological and clinical features of HEV infection: A survey in the district of Foggia (Apulia, Southern Italy). *Epidemiol Infect.* 2014;142(2):287-294. doi:10.1017/S0950268813001167
34. Rapicetta M, Monarca R, Kondili LA, Chionne P, Madonna E, Madeddu G, et al. Hepatitis e virus and hepatitis A virus exposures in an apparently healthy high-risk population in Italy. *Infection.* 2013;41(1):69-76. doi:10.1007/s15010-012-0385-8
35. Sherman KE, Terrault N, Barin B, Rouster SD, Shata MT. Hepatitis E infection in HIV-infected liver and kidney transplant candidates. *J Viral Hepat.* 2014;21(8):74-77. doi:10.1111/jvh.12233
36. Fainboim H, Gonzalez J, Fassio E, Martinez A, Otegui L, Eposto M, et al. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat.* 1999;6(1):53-57. doi:10.1046/j.1365-2893.1999.t01-1-6120135.x
37. Ferreira AC, Gomes-Gouvêa MS, Lisboa-Neto G, Mendes-Correa MCJ, Picone CM, Salles NA, et al. Serological and molecular markers of hepatitis E virus infection in HIV-infected patients in Brazil. *Arch Virol.* 2018;163(1):43-49. doi:10.1007/s00705-017-3562-3
38. Moss da Silva C, Oliveira JM, Mendoza-Sassi RA, Figueiredo AS, Mota LD da, Nader MM, et al. Detection and characterization of hepatitis E virus

- genotype 3 in HIV-infected patients and blood donors from southern Brazil. *Int J Infect Dis.* 2019;86:114-121. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.027
39. Keane FE, Gompels M, Bendall RP, Drayton R, Jennings L, Black J, et al. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med.* 2012;13(1):83-88. doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00942.x
 40. Blasco-Perrin H, Abravanel F, Blasco-Baque V, Péron JM. Hepatitis E, the neglected one. *Liver Int.* 2016;36:130-134. doi:10.1111/liv.13014
 41. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:1-16. doi:10.1038/nrdp.2017.86
 42. Brayne AB, Dearlove BL, Lester JS, Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. Genotype-Specific Evolution of Hepatitis E Virus. *J Virol.* 2017;91(9):1-16. doi:10.1128/jvi.02241-16
 43. Kenney SP, Meng XJ. Hepatitis E virus genome structure and replication strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(1):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a031724
 44. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* 2016;90(8):4232-4242. doi:10.1128/jvi.02804-15
 45. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis e virus: Advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(2):96-110. doi:10.1038/nrgastro.2017.150

46. López O. MC, Duque Jaramillo A, Navas N. MC. Clinical and epidemiology of hepatitis E virus infection. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2018;33(1):22-31. doi:10.22516/25007440.227
47. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E pathogenesis. *Viruses.* 2016;8(8):1-18. doi:10.3390/v8080212
48. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 10):2223-2232. doi:10.1099/vir.0.068429-0
49. Davis CA, Haywood B, Vattipally S, Da Silva Filipe A, AlSaeed M, Smollet K, et al. Hepatitis E virus: Whole genome sequencing as a new tool for understanding HEV epidemiology and phenotypes. *J Clin Virol.* 2021;139:104738:1-6. doi:10.1016/J.JCV.2021.104738
50. Abravanel F, Lhomme S, Dubois M, Peron JM, Alric L, Kamar N, et al. Hepatitis E virus. *Med Mal Infect.* 2013;43(7):263-270. doi:10.1016/j.medmal.2013.03.005
51. Goel A, Aggarwal R. Advances in hepatitis E – II: Epidemiology, clinical manifestations, treatment and prevention. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;10(9):1065-1074. doi:10.1080/17474124.2016.1185365
52. Murrison LB, Sherman KE. The enigma of Hepatitis e Virus. *Gastroenterol Hepatol.* 2017;13(8):484-491. Available: [/pmc/articles/PMC5572962/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3572962/)
53. Kamar N, Pischke S. Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and

- 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(7):1-12. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A031872
54. Ankcorn MJ, Ijaz S, Poh J, Elsharkawy AM, Smit E, Cramb R, et al. Toward Systematic Screening for Persistent Hepatitis e Virus Infections in Transplant Patients. *Transplantation*. 2018;102(7):1139-1147. doi:10.1097/TP.0000000000002097
55. Kuniholm MH, Ong E, Hogema BM, Koppelman M, Anastos K, Peters MG, et al. Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected U.S. Women. *Hepatology*. 2016;63(3):712-720. doi:10.1002/HEP.28384
56. Todesco E, Demeret S, Calin R, Roque-Afonso AM, Thibault V, Mallet V, et al. Chronic hepatitis e in HIV/HBV coinfecting patient: Lack of power of sofosbuvir-ribavirin. *AIDS*. 2017;31(9):1346-1348. doi:10.1097/QAD.0000000000001474
57. Park WJ, Park BJ, Ahn HS, Lee JB, Park SY, Song CS, et al. Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *J Vet Sci*. 2016;17(1):1-11. doi:10.4142/jvs.2016.17.1.1
58. Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*. 2016;64(2):350-359. doi:10.1002/hep.28668
59. Velázquez O, Stetler HC, Avila C, Ornelas G, Alvarez C, Hadler SC, et al. Epidemic Transmission of Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA J Am Med Assoc*. 1990;263(24):3281-3285.

doi:10.1001/jama.1990.03440240071018

60. Alvarado-Esquivel C, Gutierrez-Martinez VD, Ramírez-Valles EG, Sifuentes-Alvarez A. Low prevalence of anti-hepatitis E virus IgG antibodies in Tepehuanos in Mexico. *Ann Hepatol.* 2020;19(2):186-189. doi:10.1016/j.aohep.2019.08.013
61. López-Santaella T, Álvarez y Muñoz T, Medeiros-Domingo M, Moreno-Espinosa S, Consuelo-Sánchez A, Muñoz-Hernández O, et al. Serological and molecular study of Hepatitis E virus in pediatric patients in Mexico. *Ann Hepatol.* 2020;19(3):295-301. doi:10.1016/j.aohep.2019.12.004
62. García-Hernández ME, Cruz-Rivera M, Sánchez-Betancourt JI, Rico-Chávez O, Vergara-Castañeda A, Trujillo ME, et al. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):1-5. doi:10.1186/s12917-017-1208-z
63. Merino-Ramos T, Martín-Acebes MA, Casal J, Saiz JC, Loza-Rubio E. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol.* 2016;8(2):156-159. doi:10.1007/s12560-016-9231-y
64. Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Esté JA, Magris M, Liprandi F, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis e virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol.* 1994;42(3):234-236. doi:10.1002/jmv.1890420305
65. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J, et al. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina:

- Environmental and serological survey. *J Clin Virol.* 2014;61(3):334-339. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.016
66. Di Lello FA, Blejer J, Alter A, Bartoli S, Vargas F, Ruiz R, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus in Argentinean blood donors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021;33(10):1322-1326. doi:10.1097/MEG.0000000000001853
67. Kiesslich D, Rocha JE, Crispim MA. Prevalence of hepatitis E virus antibodies among different groups in the Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(2):215. doi:10.1016/S0035-9203(02)90311-1
68. Passos-Castilho AM, de Sena A, Geraldo A, Spada C, Granato CFH. High prevalence of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. *J Med Virol.* 2016;88(2):361-364. doi:10.1002/jmv.24336
69. Trinta KS, Liberto MIM, De Paula VS, Yoshida CFT, Gaspar AMC. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(1):25-29. doi:10.1590/S0074-02762001000100004
70. Vitral CL, da Silva-Nunes M, Pinto MA, de Oliveira JM, Gaspar AMC, Pereira RCC, et al. Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):1-9. doi:10.1186/1471-2334-14-458
71. Bangueses F, Abin-Carriquiry JA, Cancela F, Curbelo J, Mirazo S. Serological and molecular prevalence of hepatitis E virus among blood donors from Uruguay. *J Med Virol.* 2021;93(6):4010-4014. doi:10.1002/JMV.26231
72. Baez PA, Lopez MC, Duque-Jaramillo A, Pelaez D, Molina F, Navas MC. First

evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. PLoS One. 2017;12(5):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0177525

73. Gutiérrez-Vergara C, Quintero J, Duarte J, Suescún J, López-Herrera A. Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia Hepatitis E in pig livers production in Colombia. Genet Mol Res. 2015;14(1):2890-2899. doi:10.4238/2015.March.31.20
74. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. World J Gastroenterol. 2016;22(31):7030-7045. doi:10.3748/wjg.v22.i31.7030
75. Lhomme S, Legrand-Abrevanel F, Kamar N, Izopet J. Screening, diagnosis and risks associated with Hepatitis E virus infection. Expert Rev Anti Infect Ther. 2019;17(6):403-418. doi:10.1080/14787210.2019.1613889
76. Pérez-Gracia MT, Suay-García B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E and pregnancy: current state. Rev Med Virol. 2017;27(3):1-8. doi:10.1002/rmv.1929
77. Narayanan S, Abutaleb A, Sherman KE, Kottlilil S. Clinical features and determinants of chronicity in hepatitis E virus infection. J Viral Hepat. 2019;26(4):414-421. doi:10.1111/JVH.13059
78. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Péron J-M, Guitard J, et al. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. N Engl J Med. 2008;358(8):811-817. doi:10.1056/NEJMOA0706992/SUPPL_FILE/NEJM_KAMAR_811SA1.PDF

79. Tavitian S, Péron JM, Huynh A, Mansuy JM, Ysebaert L, Huguet F, et al. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol.* 2010;49(2):141-144. doi:10.1016/J.JCV.2010.06.016
80. Kaba M, Richet H, Ravaux I, Moreau J, Poizot-Martin I, Motte A, et al. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol.* 2011;83(10):1704-1716. doi:10.1002/jmv.22177
81. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(11):698-709. doi:10.1016/S1473-3099(08)70255-X
82. Ledesma R, Nimgaonkar I, Ploss A. Hepatitis e virus replication. *Viruses.* 2019;11(8):719:1-17. doi:10.3390/v11080719
83. Smith DB, Simmonds P. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis-a virus or host-specific pathology? *Liver Int.* 2015;35(4):1334-1340. doi:10.1111/liv.12629
84. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, Gouttenoire J. Update on hepatitis e virology: Implications for clinical practice. *J Hepatol.* 2016;65(1):200-212. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.045
85. Cheung MCM, Maguire J, Carey I, Wendon J, Agarwal K. Review of the neurological manifestations of hepatitis E infection. *Ann Hepatol.* 2012;11(5):618-622. doi:10.1016/S1665-2681(19)31434-6
86. VIH/sida. Accessed March 1, 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact->

sheets/detail/hiv-aids

87. Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3):216-226. doi:10.1016/J.EIMC.2011.01.006
88. Zhang Q, Frange P, Blanche S, Casanova JL. Pathogenesis of infections in HIV-infected individuals: insights from primary immunodeficiencies. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:122-133. doi:10.1016/J.COI.2017.09.002
89. Kemnic TR, Gulick PG. HIV Antiretroviral Therapy. [Updated 2022 Apr 30]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513308/>
90. Tompa DR, Immanuel A, Srikanth S, Kadhivel S. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *Int J Biol Macromol*. 2021;172:524-541. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2021.01.076
91. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoff J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: Mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:670957:1-17. doi:10.1155/2012/670957
92. Díaz Torres HM, Lubián Caballero AL. Definición de caso y clasificación de la infección por VIH y SIDA. *Rev cubana med*. 1998; 37(3): 157-165. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75231998000300005&lng=es.
93. Lamotte Castillo JA. Infección por VIH/sida en el mundo actual. *MEDISAN*.

2014; 18(7):993-1013.

Disponible

en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014000700015&lng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014000700015&lng=es)

94. Huerta L, Anaya-Covarrubias JY, Fierro NA. Human immunodeficiency virus and the liver: The impact of coinfection with hepatotropic viruses. *Ann Hepatol.* 2019;18(2):285-286. doi:10.1016/j.aohep.2019.03.002
95. Béguelin C, Moradpour D, Sahli R, Suter-Riniker F, Lüthi A, Cavassini M, et al. Hepatitis delta-associated mortality in HIV/HBV-coinfected patients. *J Hepatol.* 2017;66(2):297-303. doi:10.1016/J.JHEP.2016.10.007
96. Pineda JA, Cifuentes C, Parr M, Merchante N, Pérez-Navarro E, Rivero-Juárez A, et al. Incidence and natural history of hepatitis e virus coinfection among HIV-infected patients. *AIDS.* 2014;28(13):1931-1937. doi:10.1097/QAD.0000000000000378
97. Rivero-Juarez A, Cuenca-Lopez F, Martinez-Peinado A, Camacho A, Real LM, Frias M, et al. Rural habitat as risk factor for hepatitis E virus seroconversion in HIV-infected patients: A prospective longitudinal study. *Zoonoses Public Health.* 2017;64(7):60-64. doi:10.1111/ZPH.12347
98. Zeng H, Wang L, Liu P, Liao L, Wang L, Shao Y. Seroprevalence of hepatitis E virus in HIV-infected patients in China. *AIDS.* 2017;31(14):2019-2021. doi:10.1097/QAD.0000000000001585
99. Harritshøj LH, Theilgaard ZP, Mannheimer E, Midgley SE, Chiduo M, Ullum H, et al. Hepatitis E virus epidemiology among HIV-infected women in an

urban area in Tanzania. *Int J Infect Dis.* 2018;73:7-9.
doi:10.1016/J.IJID.2018.05.010

100. Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of hepatitis e Virus: Recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol.* 2015;2015:1-6. doi:10.1155/2015/872431
101. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *J Clin Med.* 2020;9(2):331:1-25. doi:10.3390/jcm9020331
102. Nouhin J, Barennes H, Madec Y, Prak S, Hou SV, Kerleguer A, et al. Low frequency of acute hepatitis E virus (HEV) infections but high past HEV exposure in subjects from Cambodia with mild liver enzyme elevations, unexplained fever or immunodeficiency due to HIV-1 infection. *J Clin Virol.* 2015;71:22-27. doi:10.1016/j.jcv.2015.07.304
103. Jardi R, Crespo M, Homs M, van den Eynde E, Girones R, Rodriguez-Manzano J, et al. HIV, HEV and cirrhosis: Evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Med.* 2012;13(6):379-383. doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00985.x
104. Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KEA, Kovari H, et al. Hepatitis E Virus Seroprevalence and Chronic Infections in Patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1074-1078. doi:10.3201/eid1706.101067
105. Zhou S, Ren L, Xia X, Miao Z, Huang F, Li Y, et al. Hepatitis E virus infection

- in HIV-infected patients: A large cohort study in Yunnan province, China. *J Med Virol.* 2018;90(6):1121-1127. doi:10.1002/JMV.25060
106. Crum-Cianflone NF, Curry J, Drobeniuc J, Weintrob A, Landrum M, Ganesan A, et al. Hepatitis E virus infection in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):502-506. doi:10.3201/EID1803.111278
107. Debes JD, Martínez Wassaf M, Pisano MB, Isa MB, Lotto M, Marianelli LG, et al. Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4+ Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina. *PLoS One.* 2016;11(7):e0160082:1-6. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0160082
108. Bezerra LA, de Oliveira-Filho EF, Silva JVJ, Santos Morais VM, Gonçalves JP, da Silva DM, et al. Risk analysis and seroprevalence of HEV in people living with HIV/AIDS in Brazil. *Acta Trop.* 2019;189:65-68. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2018.09.026
109. Scotto G, Grisorio B, Filippini P, Ferrara S, Massa S, Bulla F, et al. Hepatitis e virus co-infection in HIV-infected patients in Foggia and Naples in southern Italy. *Infect Dis (Auckl).* 2015;47(10):707-713. doi:10.3109/23744235.2015.1049658
110. Politou M, Boti S, Androutsakos T, Valsami S, Pittaras T, Kapsimali V. Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece. *J Med Virol.* 2015;87(9):1517-1520. doi:10.1002/jmv.24214
111. Hassing RJ, van der Eijk AA, Lopes VB, Snijdewind IJ, de Man RA, Pas SD, et al. Hepatitis E prevalence among HIV infected patients with elevated liver

- enzymes in the Netherlands. *J Clin Virol.* 2014;60(4):408-410.
doi:10.1016/j.jcv.2014.05.009
112. Junaid SA, Agina SE, Abubakar KA. Epidemiology and Associated Risk Factors of Hepatitis E Virus Infection in Plateau State, Nigeria. *Virol Res Treat.* 2014;5:15-26. doi:10.4137/VRT.S15422
113. Gutiérrez Vergara CC, Ospina Vélez DA, Forero Duarte JE, Rodríguez B, Gutiérrez Builes LA, Correa Londoño G, et al. Detección serológica y molecular del virus de la Hepatitis E en cerdos de granjas antioqueñas. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 2014;9(2):158-168. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072014000200002&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1900-9607
114. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006;131(1):65-71. doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.004
115. Real-time RT-PCR Primers and Probes for COVID-19 | CDC. Accessed April 23, 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
116. de Alba ADR, Rueda A. Problema Bioquímico Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Rev Educ Bioquímica.* 2013;32(1):36-39. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-

19952013000100006&lng=es&nrm=iso>.

117. Raji YE, Toung OP, Taib NM, Sekawi Z Bin. Hepatitis E Virus: An emerging enigmatic and underestimated pathogen. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(1):499-512. doi:10.1016/J.SJBS.2021.09.003
118. Narayanan S, Abutaleb A, Sherman KE, Kottlil S. Clinical features and determinants of chronicity in hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 2019;26(4):414-421. doi:10.1111/jvh.13059
119. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(1):24-33. doi:10.1038/NRGASTRO.2012.187
120. Al-Sadeq DW, Majdalawieh AF, Mesleh AG, Abdalla OM, Nasrallah GK. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J Med Microbiol.* 2018;67(4):466-480. doi:10.1099/JMM.0.000706/CITE/REFWORKS
121. Zeng H, Wang L, Liu P, Liao L, Wang L, Shao Y. Seroprevalence of hepatitis e virus in HIV-infected patients in China. *AIDS.* 2017;31(14):2019-2021. doi:10.1097/QAD.0000000000001585
122. Hakim MS, Wang W, Bramer WM, Geng J, Huang F, de Man RA, et al. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver Int.* 2017;37(1):19-31. doi:10.1111/LIV.13237
123. Junaid SA, Agina SE, Abubakar KA. Epidemiology and Associated Risk Factors of Hepatitis E Virus Infection in Plateau State, Nigeria. *Virol Res Treat.* 2014;5:15-26. doi: 10.4137/VRT.S15422

124. Payne BAI, Medhi M, Ijaz S, Valappil M, Savage EJ, Gill ON, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(2):333-336. doi:10.3201/EID1902.121174
125. Lanini S, Garbuglia AR, Lapa D, Puro V, Navarra A, Pergola C, et al. Epidemiology of HEV in the mediterranean basin: 10-year prevalence in Italy. *BMJ Open.* 2015;5(7):e007110:1-6. doi:10.1136/BMJOPEN-2014-007110
126. Spada E, Costantino A, Pezzotti P, Bruni R, Pisani G, Madonna E, et al. Hepatitis E virus infection prevalence among men who have sex with men involved in a hepatitis A virus outbreak in Italy. *Blood Transfus.* 2019;17(6):428-432. doi:10.2450/2019.0209-19
127. Greco L, Uceda Renteria SC, Guarneri D, Orlandi A, Zoccoli A, Benardon S, et al. HEV and HAV seroprevalence in men that have sex with men (MSM): An update from Milan, Italy. *J Med Virol.* 2018;90(8):1323-1327. doi:10.1002/JMV.25052
128. Dolcetti R, Gloghini A, Caruso A, Carbone A. A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood.* 2016;127(11):1403:1-20. doi:10.1182/BLOOD-2015-11-681411
129. Boasso A, Shearer GM, Chougnet C. Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it? *J Intern Med.* 2009;265(1):78:1-49. doi:10.1111/J.1365-2796.2008.02043.X
130. Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukobza S, Jebblaoui A, Tessé S, Savary J, et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA

- detection. *J Clin Virol.* 2013;58(1):36-40. doi:10.1016/J.JCV.2013.06.038
131. Bura M, Bukowska A, Bura A, Michalak M, Mozer-Lisewska I. Hepatitis E virus antibodies in HIV-infected patients and blood donors from western Poland: A preliminary report. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(4):577-579. doi:10.17219/ACEM/62353
132. Bivigou-Mboumba B, Rouet F, Mouinga-Ondeme A, Deleplancque L, Sica J, Ndjoyi-Mbiguino A, et al. Portage des infections à hépatites virales B, C et E chez les patients infectés par le VIH à Franceville au Gabon : étude transversale rétrospective. *Med Sante Trop.* 2017;27(3):274-280. doi:10.1684/MST.2017.0698
133. Crum-Cianflone NF, Curry J, Drobeniuc J, Weintrob A, Landrum M, Ganesan A, et al. Hepatitis E Virus Infection in HIV-infected Persons. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):502:1-10. doi:10.3201/EID1803.111278
134. Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods.* 2006;137(2):325-333. doi:10.1016/J.JVIROMET.2006.07.004
135. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113(5):1014-1026. doi:10.1111/J.1365-2672.2012.05384.X
136. Jimnez VC, Wit FWNM, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-

Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis.* 2016;214(2):216-225. doi:10.1093/INFDIS/JIW146

137. Shrestha A, Adhikari A, Bhattarai M, Rauniyar R, Debes JD, Boonstra A, et al. Prevalence and risk of hepatitis e virus infection in the HIV population of Nepal. *Virology*. 2017;14(1):1-7. doi:10.1186/S12985-017-0899-X/FIGURES/3

12. Anexos

12.1 Consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Escuela de Microbiología

CONSENTIMIENTO INFORMADO

SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE HEPATITIS E EN INDIVIDUOS QUE PARTICIPAN EN EL PROGRAMA DE ATENCIÓN INTEGRAL A PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH EN MEDELLÍN

Instituciones que respaldan el estudio: Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB.

Fuente de financiación: Comité para el Desarrollo de la Investigación -CODI 2017.

Identificación de los responsables del estudio.

-Astrid Milena Bedoya. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia. Datos de contacto: teléfono 2195490. Milena.bedoya@udea.edu.co.

-Juan Carlos Alzate. Coordinador Unidad de Investigación Clínica. Grupo de Micología Médica y Experimental. Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB. Datos de contacto: teléfono 6051808 Ext 119. jalzate@cib.org.co.

Por favor, antes de firmar este consentimiento informado, lea cuidadosamente. En caso de necesitar más información o tener dudas, solicitar explicación a los responsables del Proyecto "SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE HEPATITIS E EN INDIVIDUOS QUE PARTICIPAN EN EL PROGRAMA DE ATENCIÓN INTEGRAL A PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH EN MEDELLÍN".

Su participación en este proyecto, consiste en responder las preguntas que aparecen en el cuestionario que se le entregará adicional a este documento, así como la toma de una muestra de sangre. Aunque decida en este momento participar, puede retirarse del estudio en cualquier momento, y no habrá ningún tipo de sanción o castigo. Si decide continuar y autorizar el uso de sus datos para el análisis, será necesario que firme en la última página del presente formato.

Objetivo del estudio

Determinar la prevalencia de la infección por el virus de Hepatitis E en individuos infectados con el virus de Inmunodeficiencia Humana.

Importancia del estudio

A pesar de que existen pruebas serológicas y moleculares para la detección de la infección por el VHE, en Colombia no se ha implementado el uso de la prueba serológica.

La infección por el VHE no es de notificación obligatoria y por tanto no se reporta a la Dirección Seccional de Salud de Antioquia, generando un desconocimiento acerca de la seroprevalencia en la población general y en individuos inmunosuprimidos. Todos estos antecedentes, hacen necesario evaluar el comportamiento sero-epidemiológico de esta infección viral en este grupo de riesgo.

El conocimiento de la asociación entre la seropositividad del VHE y las características sociodemográficas de personas con diagnóstico de la infección con el VHE en pacientes VIH+ sería de gran relevancia para la generación de discusiones académicas-científicas en la que se destaque la importancia de la búsqueda activa de esta infección para la implementación de algoritmos de diagnóstico en este grupo de riesgo en Colombia.

La participación en el estudio dependerá del tiempo que usted tome en responder el cuestionario y la toma de muestra de la sangre.

¿En qué procedimientos participa?

Para el estudio serán seleccionados de manera aleatoria 430 individuos que hacen parte del programa de atención integral a pacientes con infección por VIH en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) de la ciudad de Medellín.

Si usted acepta participar en el estudio, se le tomará una muestra de sangre para realizar los análisis de seropositividad, es decir determinar si en su sangre hay anticuerpos que son las sustancias que su cuerpo ha producido para defenderse del virus de la Hepatitis E. Además, se le entregará una encuesta que consta de 29 preguntas sobre información socioeconómica, sociodemográfica, estado de salud y conductas sexuales.

Beneficios por participar en el estudio

El estudio permitirá recolectar información acerca de la prevalencia de la infección por el virus de Hepatitis E en individuos infectados con el virus de Inmunodeficiencia Humana.

En este estudio su participación es voluntaria y, usted no recibirá un pago o remuneración de ninguna especie.

Riesgos para el participante

Considere que la toma de la muestra y de los datos personales representan un **Riesgo mínimo** para la salud según el artículo número 11 de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Protección Social. En caso de presentar molestias debido a la toma de muestra, usted puede contactar al Dr. Juan Carlos Alzate, quien le prestará asesoría gratuita, en los teléfonos: 6051808 Ext 119.

Confidencialidad del participante

Los responsables del estudio se comprometen a que:

- El nombre del participante no será incluido en la encuesta
- La muestra de sangre será identificada solo con códigos, sin que aparezca su nombre.
- La información que suministre para efectos de este estudio es de carácter confidencial y se guardará en forma digital (base de datos), sin que aparezca su nombre.
- Ningún dato que pueda identificar al paciente será motivo de publicación, pero los datos generales podrán hacer parte de publicaciones científicas.

¿Puedo negarme a participar en el estudio?

Su participación en el presente estudio es voluntaria. Usted puede elegir no participar. También puede retirarse en cualquier momento, haciendo la notificación a alguno de los investigadores del estudio. Si usted decide no participar en el estudio o retirarse luego de iniciado el proceso puede hacerlo voluntaria y libremente.

Si decide no firmar este formato, no podrá participar en el estudio.

Al firmar esta autorización usted acepta participar en el estudio e indicará que usted libremente consiente participar en este estudio de investigación. Además, se le entregará una copia del consentimiento informado.

Para cualquier aclaración o duda relacionada con este estudio favor comunicarse con la investigadora principal del estudio Dra. Astrid Milena Bedoya. MSc, PhD al teléfono (4) 219 5490, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

Consentimiento

He leído y entendido la información que aparece en este documento. Estoy enterado de los riesgos y beneficios de este estudio, sé que puedo retirarme en cualquier momento de éste y autorizo que la información recolectada será utilizada únicamente con fines investigativos y académicos.

Yo he leído y entiendo este formato de consentimiento. Todas mis preguntas han sido resueltas. Me presento voluntariamente para participar en este estudio.

Acepto participar en el estudio.

Firma Participante: _____

Firma: _____

Número de identificación: _____

Teléfono de contacto: _____

Dirección de residencia: _____

TESTIGO 1	TESTIGO 2
Parentesco	Parentesco
Nombre	Nombre
Firma	Firma
Número de identificación	Número de identificación
Dirección de residencia	Dirección de residencia

Nombre del investigador: _____

Firma: _____

Número de identificación: _____

Fecha: _____

Consentimiento extendido: Se garantiza que su muestra de sangre no va a ser utilizada para investigaciones que tengan que ver con clonación, estudios de cromosomas ni similares. Si usted está de acuerdo con que la sangre se conserve para futuras investigaciones relacionadas con el VIH autorizadas por un comité de bioética, debe firmar al final del párrafo; en caso contrario, el remanente de la muestra será destruida mediante las técnicas usuales para desechos orgánicos que rigen en la Universidad de Antioquia.

Firma

12.2 Encuesta

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
ENCUESTA

SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE HEPATITIS E EN INDIVIDUOS QUE PARTICIPAN EN EL PROGRAMA DE ATENCIÓN INTEGRAL A PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH EN MEDELLÍN

La siguiente encuesta cuenta con 30 preguntas, las cuales el participante acepta diligenciar en su totalidad y de manera veraz (Siempre en compañía de un profesional del centro médico quien responderá las inquietudes que surjan).

Marque con una X una única respuesta:

INFORMACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA

1. **Sexo:** 1. Femenino ___ 2. Masculino ___
2. **En caso de ser mujer responda:**
Actualmente se encuentra en embarazo 1. Si ___ 2.No ___
En caso de marcar la opción "Sí", en qué trimestre del embarazo se encuentra:
1. Primer ___ 2. Segundo ___ 3.Tercero ___
3. **¿Cuántos años cumplidos tiene?** ___
4. **¿Cuál es su grado de escolaridad?** 1.Ninguno ___ 2.Primaria ___ 3. Secundaria ___
4.Técnico ___ 5.Tecnólogo ___ 6.Universitario ___
5. **Departamento y municipio de residencia:** _____
6. **¿En qué zona del Municipio reside usted?** 1. Rural ___ 2.Urbana ___
7. **¿Hace cuántos años reside en el Municipio?** ___

INFORMACIÓN SOCIOECONÓMICAS

8. **¿Cuál es su ocupación?** 1.Ama de casa ___ 2.Empleado ___ 3.Jubilado ___
4.Estudiante ___ 5.Otro ___
9. **¿De dónde proviene el agua que consume?** Marque por favor todas las opciones con las que esté de acuerdo.
1. Acueducto ___

En caso de señalar esta opción responda : **Usa esta fuente para:** 1. Preparación de Alimentos y consumo ___ 2. Regar cultivos ___ 3. Lavar porquerizas, establos, gallineros etc. ___

2. Fuente propia (Aguas corrientes) ___

En caso de señalar esta opción responda : **Usa esta fuente para:** 1. Preparación de Alimentos y consumo ___ 2. Regar cultivos ___ 3. Lavar porquerizas, establos, gallineros etc. ___

3. Pozo ___

En caso de señalar esta opción responda : **Usa esta fuente para:** 1. Preparación de Alimentos y consumo ___ 2. Regar cultivos ___ 3. Lavar porquerizas, establos, gallineros etc. ___

4. Otros ___

En caso de señalar esta opción responda : **Usa esta fuente para:** 1. Preparación de Alimentos y consumo ___ 2. Regar cultivos ___ 3. Lavar porquerizas, establos, gallineros etc. ___

HÁBITOS

10. ¿Hierve el agua antes de beberla?: 1. Si ___ 2.No ___

11. ¿Lava usted los alimentos que consume crudos, como frutas y verduras?

Si ___ No ___

12. ¿Usted se lava las manos después de ir al baño? 1.Si ___ 2.No ___

13. ¿Dónde se depositan las aguas residuales de su vivienda? 1. Alcantarillado ___

2.Pozo séptico ___ 3. En la quebrada ___ 4.Otro ___

14. ¿Tiene relación usted con alguno de estos animales?

1.Cerdos ___ 2.Gallinas ___ 3.Gatos ___ 4. Caprinos ___ 5. Conejos ___ 6. Otro ___

7. Ninguno ___

En caso de marcar la opción 1. Cerdos, indique por favor qué tipo de relación tiene:

1. Limpieza de porquerizas ___ 2. Castración ___ 3. Inmunización ___ 4. Otra ___

¿Cuál? ___

ESTADO DE SALUD

15. Al momento de ingresar al estudio está recibiendo tratamiento antirretroviral

Si ___ No ___

16. Estado de infección de VIH según la OMS

1. A1

2. A2

3. A3

4. B1

5. B2

6. B3

7. C1

8. C2

9. C3

17. Número total de LTCD4

18. Número de LTCD4 según el rango

19. Número de copias/ml del ARN viral

ANTECEDENTES

20. ¿Ha sido usted vacunado contra hepatitis A? 1. Si ___ No ___

En caso de marcar la opción 1. Sí, indique por favor el año en que fue vacunado: _____

21. ¿Ha sido usted vacunado contra hepatitis B? Si ___ No ___

En caso de marcar la opción 1. Sí, indique por favor el año en que fue vacunado: _____

22. ¿Ha sido usted diagnosticado anteriormente con hepatitis? Si ___ No ___

En caso de marcar la opción 1. Sí, indique por favor el año en que fue diagnosticado:

En caso de marcar la opción 1. Sí, indique por favor el tipo de hepatitis: 1. Hepatitis

A: ___ 2. Hepatitis B: ___ 3. Hepatitis C: ___ 4. Hepatitis de origen no viral: ___ 5. No sabe: ___

ESTATUS SEROLÓGICO (Debe ser diligenciado por el grupo de investigadores)

23. Presencia de IgM de HepE en el suero del paciente

Si ___ No ___

24. Presencia de IgG de HepE en el suero del paciente

Si ___ No ___

FUNCION HEPATICA

25. Niveles de Transaminasas ALT Y AST

26. Niveles de Fosfatasa alcalina

TRATAMIENTO

27. Antirretroviral _____

28. Otros _____

CONDUCTAS SEXUALES

29. Sexo anal: SI NO

30. Sexo oral: SI NO

12.3 Acta de aprobación por el comité de ética.

COMITÉ DE BIOÉTICA SEDE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA CBE-SIU

ACTA DE APROBACION: 20-35-829

Nombre completo del proyecto: "Seroprevalencia del virus de hepatitis e en individuos que participan en el programa de atención integral a pacientes con infección por VIH en Medellín"

Sometido por: Astrid Milena Bedoya.

Fecha en que fue aprobado por el comité: 04 de marzo de 2020

La SEDE DE INVESTIGACION UNIVERSITARIA constituyó mediante la Resolución 001 de Mayo 2 de 2005 de la Dirección Científica de la SIU el Comité de Bioética de investigación en Humanos CBE-SIU, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última actualización del año 2013; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991) y la Resolución 2378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social de Colombia que adopta las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos (cuando aplique).

El CBE SIU certifica que:

1. Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos del proyecto:

- a. Protocolo de investigación (Explicación y ampliación si el estudio está enmarcado dentro de un macroproyecto).
- b. Formato(s) de consentimiento y/o asentimiento informado
- c. Hojas de vida de los investigadores
- d. Formato de recolección de datos
- e. Folleto del investigador
- f. Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
- g. Informe de actividades-renovación de aval

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité de Bioética.

(El Comité de Bioética cuenta con seis (6) integrantes, para que haya quórum es necesario la presencia de al menos cuatro (4) de ellos, en la reunión del 04 de marzo participaron):

Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria CBE-SIU
Edificio SIU: Calle 62 52-59 Teléfono: (574) 2196402

Medellín - Colombia

Página 1 de 3

ALBERTO TOBÓN CASTAÑO- PhD en Salud pública y metodología de investigación Biomédica

DANIEL FLÓREZ MEDINA- Magister en bioética y derecho

HILDA INÉS ESCOBAR MESA- Paramédica

JASMÍN VIVIANA CACANTE- PhD en Bioética

NATALIA PAOLA LONDOÑO ARANGO- Especialización en responsabilidad civil y seguros

3. **El Comité consideró que el presente estudio:** Es válido desde el punto vista ético. La investigación representa un riesgo mínimo para los sujetos que participan.
4. Conforme con la Resolución 8430 de 1993, el Comité tendrá acceso permanente a los datos del estudio, sin que esto vulnere la confidencialidad de la información de los participantes.
5. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
6. El Comité considera adecuada la forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio.
7. El Comité informará inmediatamente a los entes reguladores, correspondientes según el caso
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. El Comité informará inmediatamente a las directivas de la SIU, toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación
 - b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
9. El presente proyecto queda aprobado por un periodo de un (1) año más partir de la fecha de aprobación.

Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente a este comité, con todos los documentos que permitan su revisión actualizada: estos incluyen, informe de actividades relacionadas con la captación y seguimiento de los participantes, fecha de iniciación, modificaciones solicitadas y previamente aprobadas por este Comité. El informe debe constar con toda la información relativa a los participantes y al mecanismo de toma de consentimiento informado.
10. El Investigador principal deberá:

Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria CBE-SIU

Edificio SIU: Calle 62 52-59 Teléfax (574) 2196402

Medellín - Colombia

- a. Informar cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del CBE-SIU excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar cualquier situación imprevista que se considere implica riesgos para los sujetos, la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar cualquier evento adverso serio de algún participante, comunicando la situación a la secretaria y a la presidencia del CBE-SIU, dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente, tal como lo dispone la resolución 2378 de 2008 y la resolución 2011020764 de 2011, ambas del Ministerio de la Protección Social.
- d. Poner en conocimiento del Comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones y las implicaciones que esto tiene para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

11. Observaciones

El Comité de Bioética consideró satisfactorias las respuestas a las observaciones planteadas al proyecto de la referencia.

Se solicita que una vez sean incluidos los cambios en el documento del protocolo, estos sean enviados al comité para su revisión (con control de cambios).



Nombre: Jasmin Viviana Cacante Caballero

Título: Enfermera, PhD en Bioética

Cargo CBE-SIU: Presidenta

Proyectó: María Coral Correa

Administradora en Salud

Asistente CBE-SIU