

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*



**“Detección molecular de Virus de la Hepatitis A y Norovirus en PCR tiempo real en moluscos bivalvos de consumo nacional expedidos en mercados en Lima y Callao, Perú”**

Tesis para optar el título profesional de:  
**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**Brenda Mercedes Aylas Jurado**  
**Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**LIMA-PERÚ**

**2020**

*Dedicado con mucho cariño a mis padres, a mis  
abuelos que me acompañan desde el cielo y a  
Héctor.*

Eternamente agradecida con mi alma Mater Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por todos los conocimientos brindados y la formación como Médico Veterinario Zootecnista, al Laboratorio de Biología Molecular, el lugar donde pude realizar mi tesis sin inconvenientes.

Gracias al Dr. Armando Hung y a la Blga. Marcela Mora por brindarme todo su apoyo y ser mis mentores durante la realización del proyecto de investigación.

Agradezco a mis padres Olga y Raúl por acompañarme en todo el proceso de mi formación académica y su apoyo incondicional.

Agradezco a Dios.

## ABSTRACT

The economic income from cultivation of hydrobiological species such as shellfish has been increasing in a sustainable way over the years. Bivalve molluscs are found in natural banks and cultivation areas defined by the competent health authority on the basis of a surveillance and control program with contamination indicators. There is evidence of enteric virus contamination in buffer, harvesting, and effluent areas. Therefore, the main aim of this study was to detect the presence of hepatitis A virus and Norovirus genogroup 1 and 2, using RT-qPCR in Mussels (*Mytilidae*), scallops (*Argopecten purpuratus*) and coquina clams (*Donax spp.*) collected from Ventanilla, Minka, Chorrillos, Jesús María and Breña markets in Lima and Callao, Peru. Norovirus G1 and G2 was detected in low amounts 3.78 copies/  $\mu$ l and 222 copies/ul respectively in one of (3%) scallops “*Argopecten purpuratus*” sample, no samples were positive to hepatitis A. The results show the importance to develop new strategies and surveillance programs for controlling and reducing the risk of human illness from shellfish consumption in Peru.

**Keywords:** *Bivalve molluscs, RT-qPCR, Hepatitis A, Norovirus.*

## RESUMEN

El ingreso económico del cultivo de especies hidrobiológicas como los mariscos ha aumentado de manera sostenible a lo largo de los años. Los moluscos bivalvos se encuentran en bancos naturales y áreas de cultivo definidas por la autoridad sanitaria competente sobre la base de un programa de vigilancia y control con indicadores de contaminación. Hay evidencia de contaminación por virus entéricos en zonas de amortiguamiento, recolección y efluentes. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue detectar la presencia del virus de la hepatitis A y Norovirus genogrupo 1 y 2, utilizando RT-qPCR en mejillones (*Mytilidae*), conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) y almejas coquina (*Donax spp.*). Recolectadas de Ventanilla, Minka, Chorrillos, Jesús María y Breña en Lima y Callao, Perú. Norovirus G1 y G2 se detectó en concentraciones bajas 3.78 copias/ul y 222 copias/ µl respectivamente en una de las muestras (3%) de conchas de abanico “*Argopecten purpuratus*”, ninguna muestra fue positiva a hepatitis A. Los resultados muestran la importancia de desarrollar nuevas estrategias y programas de vigilancia para controlar y reducir el riesgo de enfermedades humanas por el consumo de mariscos en el Perú.

**Palabras claves:** *Moluscos bivalvos, RT-qPCR, hepatitis A, Norovirus.*

# INTRODUCCIÓN

El cultivo de especies hidrobiológicas genera importantes ingresos a la economía del país, incrementándose de manera sostenible a través de los años (Bernedo *et al*, 2018), con lo cual ha llevado a una reestructuración de las normas sanitarias, con el propósito de mantener los estándares de calidad e inocuidad acordes a lo estipulado por las normas internacionales de la Unión Europea. A pesar de que los productos de exportación pasan por una rigurosa evaluación y cuentan con certificación libres de patógenos (bacterias y virus); no existe un seguimiento sanitario ni certificado que determine la ausencia o presencia de virus entéricos en los moluscos bivalvos (pectínidos y no pectínidos) de consumo nacional.

En Perú se aplica la Norma Sanitaria de Moluscos Bivalvos, que establece que las zonas de cultivos autorizadas deben estar delimitadas, ser evaluadas, clasificadas y sometidas a un programa de vigilancia sanitaria por la Autoridad Competente SANIPES (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). Divididas en tres categorías de áreas de producción:

- Áreas aprobadas o tipo A, en el cual los moluscos bivalvos recolectados están destinados al procesamiento o comercialización para el consumo humano directo.
- Áreas condicionalmente aprobadas o tipo B, en el cual los moluscos bivalvos deben pasar por un proceso de depuración y haber pasado las medidas de control sanitario para su comercialización y consumo.
- Áreas condicionalmente aprobadas tipo C donde los moluscos bivalvos recolectados deben pasar por el proceso de depuración y tratamiento térmico y posteriormente deben pasar por un control sanitario.

Por último, en las áreas no autorizadas que no alcanzan a cumplir con los criterios sanitarios establecidos, está prohibida la extracción o recolección de moluscos bivalvos para consumo humano ya que constituye un riesgo sanitario (D.S.007-2004-PRODUCE).

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores de nutrientes y accidentalmente de bacterias y partículas virales que pueden estar contaminando las áreas de cultivo, estas se acumulan en la hepatopáncreas, permaneciendo estables durante largos periodos de tiempo. Las partículas extrañas también pueden ser eliminadas por evacuación. Ésta ocurre cuando el hemocito fagocita una partícula y se mueve a través de las barreras epiteliales (diapédesis) hasta el lumen digestivo y excretor (Tripp,1960; Fisher 1986). El consumo de estos productos crudos o mínimamente cocinados es uno de los factores causantes de gastroenteritis y hepatitis.

Por lo general, los moluscos bivalvos causantes de esos cuadros clínicos provienen de áreas contaminadas (Romalde, 2004). Sin embargo, también pueden proceder de zonas de cultivo delimitadas por la autoridad sanitaria. El programa de vigilancia epidemiológica y control sanitario de los moluscos bivalvos se basa en el monitoreo de *E. coli*, virus de Hepatitis A en los bivalvos y de coliformes fecales en el agua, siendo considerados los principales agentes que pueden impactar las zonas de cultivo y la zona de amortiguamiento, debido a los efluentes de los poblados, actividad antropogénica que contamina ríos, quebradas, drenes, entre otros.

En relación al virus de la hepatitis A (VHA) es un hepatovirus ARN monocatenario sin envoltura, perteneciente a la familia *Picornaviridae*; es un virus pequeño (60-70 nm) (Vilariño, 2009). La vía de transmisión es oral-fecal, a través del consumo de alimentos contaminados; llegando a replicarse en los hepatocitos, ocasionando una hepatitis infecciosa (Murray *et al*, 2009).

El periodo de incubación es entre 14 a 28 días. La hepatitis A es una de las causas más frecuentes de infección de transmisión alimentaria, ocasionando una morbilidad moderada a

grave, produciendo una insuficiencia hepática aguda, los síntomas son ictericia, fiebre, náuseas, dolor abdominal, pérdida de apetito y astenia, el tratamiento es netamente sintomatológico. La enfermedad está asociada a la escasez de agua salubre, saneamiento deficiente y una mala higiene (OMS, 2019).

En Shanghái, China en 1988, hubo un brote de hepatitis A relacionado al consumo de almejas recolectadas en un área contaminada con aguas residuales afectando a 300.000 personas (Lees D, 2000); en 1997, se reportaron 467 casos de hepatitis A, en el cual hubo una fuerte asociación entre la enfermedad y el consumo de ostras (Conaty *et al*, 2000); Sánchez *et al* (2002) detectaron hepatitis A mediante la caracterización molecular en muestras congeladas de almejas implicadas en un brote en España en 1999. En muestras de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales de Pune, India se encontró que el 24,42% (21/86) de muestras de agua eran positivas al virus de la hepatitis A (Vaidya *et al*, 2002). Pina *et al*. (2001) detectaron que el 57,4% de 54 muestras de aguas residuales domésticas crudas y 59,2% de 66 muestras de agua de río eran positivas al virus de hepatitis A.

En España, se determinó la relación entre el consumo de coquinas o palabritas (*Donax spp*) importadas de Perú y 2 brotes de hepatitis A. El primer brote ocurrió en 1999 con 189 toneladas de coquinas y el segundo brote ocurrió en 2008 con 3.766 toneladas. Para la detección del VHA utilizaron un método de extracción con proteinasa K, basado en tiocianato de guanidina y perlas magnéticas para la extracción de ARN viral, y el método qRT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa Reversa) para hepatitis A permitió detectar el virus en 44% de muestras asociadas con los casos (Pintó *et al*, 2009).

Marcos *et al*. (2014) realizaron un estudio para evaluar la contaminación del río Sechura, en el cual 2/24 (8.3%) muestras de agua resultaron positivas a VHA. Chú (2017) analizó muestras de agua del río Piura y palabritas entre febrero del 2016 a febrero del 2017, detectando 3 muestras positivas a hepatitis A en la bahía de Mórrope.



En el caso del virus de Norwalk o Norovirus es un virus monocatenario ARN sin envoltura, perteneciente a la familia *Caliciviridae*, se clasifica en cinco genogrupos (GI-GV) basándose en las secuencias parcial o completa del gen de la cápside, solo los genogrupos GI, GII y GIV tienen un impacto en la salud pública, ya que es una enfermedad transmisible por alimentos causante de gastroenteritis en humanos (Murray *et al.*, 2009).

La infección por Norovirus en humanos afecta a cualquier grupo etario y está asociada al consumo de moluscos bivalvos, aguas no tratadas; los síntomas son diarrea, náuseas, vómitos, fiebre y dolor abdominal, en otras palabras, son similares a una gastroenteritis causada por enterobacterias; por lo que no se realiza el diagnóstico definitivo y son descritas como una gastroenteritis leve. Asimismo, presenta un periodo de incubación de 1 a 4 días, los síntomas se presentan dentro de las 24 a 48 horas tras la ingesta del producto contaminado, y duran 2 días aproximadamente (Vilariño, 2009).

Mayoral *et al.* (2000) describió el estudio de un brote de gastroenteritis aguda de probable origen hídrico en una residencia de ancianos en España, el cual se logró aislar Norovirus en heces de 4 enfermos, siendo este el agente causal del brote; encontrando una prevalencia de 2.8%.

Durante 3 años (2003-2006), se realizó un estudio en la Amazonía peruana con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), en el cual el 32,8% de 7226 muestras de heces de niños resultaron positivas para Norovirus genogrupoo 1 y 67,2% resultaron positivas a Norovirus genogrupo 2, además se encontró que un 6,5% de niños presentaron infecciones mixtas (GI/GII) (Yori *et al.*, 2009).

Moreno (2012) reportó 23.1% positivas a Norovirus en 329 muestras de *Mytilus galloprovincialis*, *Callista chione*, *Chamelea gallina* y *Ruditapes decussatus* en Granada,

España. Mediante la técnica RT-qPCR se detectó Norovirus en 39 (24.4%) de 160 muestras de moluscos analizadas, 18 muestras (46.2%) de estas pertenecían a Norovirus G1 (genogrupo 1) y 21 muestras (53.8%) pertenecían al Norovirus G2 (genogrupo 2); también se detectó en 71 (44.4%) de 160 muestras el virus de la hepatitis A (Fernández, 2013).

Durante el año 2013 empleando el método qRT-PCR, Ritchie *et al.* (2018) detectaron 5/24 (20.8%) positivos a Norovirus G1 en muestras de agua recolectadas en el Río Piura, ninguna muestra fue positiva para Norovirus G2. Chú (2017) detectó Norovirus G1 en 9 (6.47%) de 139 muestras de agua recolectadas y palabritas “*Donax spp.*” en las bahías de Mórrope y Sechura a través de la técnica de PCR en tiempo real.

Las detecciones de virus entéricos se realizan mediante el uso de la técnica de qRT-PCR, debido a su alta sensibilidad y especificidad que permite cuantificar un número muy bajo de partículas víricas en la muestra (Lees D, 2000). El qRT-PCR tiene mayores ventajas como menor riesgo de contaminación cruzada al emplearse una sonda marcada durante la amplificación, se evita la posterior confirmación mediante secuenciación y al ser una técnica cuantitativa, puede ser estandarizada (Jothikumar *et al.*, 2005; Loisy *et al.*, 2005; Costafreda *et al.*, 2006).

Este trabajo de investigación tiene como objetivo la detección de virus de la hepatitis A y Norovirus genogrupos 1 y 2, mediante qRT-PCR en moluscos bivalvos de consumo local expedidos en mercados de Lima y Callao, debido a que estas enfermedades gastroentéricas tienen un impacto en la salud pública.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Tipo de estudio

Observacional descriptivo

## Lugar y fecha de muestreo

Se seleccionaron 5 mercados al azar, siendo elegidos los puestos de manera aleatoria, donde se comercializan productos hidrobiológicos de Lima y Callao: Terminal pesquero Minka, Terminal pesquero de Ventanilla, Terminal pesquero de Chorrillos, mercado San José en el distrito de Jesús María y mercado Nuevo Milenio ubicado en Breña. 33 muestras fueron tomadas de octubre a noviembre del 2019 con una frecuencia quincenal realizando compósitos de 10 y 40 individuos dependiendo de la especie (Tabla 1) para obtener un tamaño de muestra analítica de 2 g (hepatopáncreas) y 100 cm<sup>2</sup> de músculo y gónada (hisopado) siguiendo los criterios de la Norma ISO/TS 15216-2:2013.

**Tabla 1.** Muestras analizadas en el estudio.

Procedencia	Especie	Fecha de muestreo	Tamaño de muestra (N° de individuos por compósito)	Tipo de muestra analítica
Terminal pesquero Minka	<i>Argopecten purpuratus</i>	4/10/19	10	Hepatopáncreas
		19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Mytilidae</i>	4/10/19	10	Hepatopáncreas
		19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Donax spp.</i>	4/10/19	40	Hepatopáncreas
		19/10/19	40	Hepatopáncreas
		3/11/19	40	Hepatopáncreas
Terminal pesquero de Ventanilla	<i>Argopecten purpuratus</i>	4/10/19	10	Hepatopáncreas
		19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas

		4/10/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Mytilidae</i>	19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas
<b>Terminal pesquero de Chorrillos</b>		4/10/19	10	Hisopado
	<i>Argopecten purpuratus</i>	19/10/19	10	Hisopado
		3/11/19	10	Hisopado
		4/10/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Mytilidae</i>	19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas
<b>Mercado San José Jesús María</b>		4/10/19	10	Hisopado
	<i>Argopecten purpuratus</i>	19/10/19	10	Hisopado
		3/11/19	10	Hisopado
		4/10/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Mytilidae</i>	19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas
<b>Mercado Nuevo Milenio Breña</b>		4/10/19	10	Hisopado
	<i>Argopecten purpuratus</i>	19/10/19	10	Hisopado
		3/11/19	10	Hisopado
		4/10/19	10	Hepatopáncreas
	<i>Mytilidae</i>	19/10/19	10	Hepatopáncreas
		3/11/19	10	Hepatopáncreas

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Criterios de inclusión: Moluscos bivalvos en buen estado con textura firme y libres de olores no característicos.

Criterios de exclusión: Moluscos bivalvos procesados o congelados y con presencia de materia extraña.

### **Recolección de muestras**

Las muestras fueron colocadas en doble bolsa de polietileno de primer uso y transportadas en coolers con gel packs, siguiendo una cadena de frío menor a 8 °C, al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia, y fueron conservadas a -80 °C (Resolución Directorial N° 006-2017-SANIPES-DSNPA).

### **Extracción de ARN**

La extracción se realizó siguiendo los protocolos de la Norma ISO/TS 15216-2:2013; utilizando compósitos de 10 individuos de conchas de abanico "*Argopecten purpuratus*", 10 de choros "*Mytilidae*" y 40 palabritas "*Donax spp*" por muestra. Se recolectó un total de 33 muestras o compósitos y fueron clasificadas por fecha y procedencia.

Para los moluscos que conservan ambas valvas, se realizó el siguiente procedimiento: Utilizando materiales quirúrgicos estériles, se aisló asépticamente la hepatopáncreas de cada individuo, se homogenizó y pesó 2 gramos; se agregó 2 ml de proteinasa K (30U/mg) (Thermo Scientific, EEUU) y se incubó a 37 °C x 320 oscilaciones/minuto durante 60 minutos, seguido de 15 minutos a 60 °C. Se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos y se recolectó el sobrenadante para la extracción de ARN con el kit Nuclisens system (BioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En moluscos desvalvados con ausencia de hepatopáncreas, se utilizó el protocolo de superficies según la Norma ISO/TS 15216-2:2013, hisopando 100 cm<sup>2</sup> de gónada y músculo en una placa Petri estéril y se realizó la extracción del ARN con el kit Nuclisens system (BioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN obtenido se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### **Detección de RT-PCR en tiempo real**

Se utilizaron los cebadores y sondas según la Norma ISO/TS 15216-2:2013 (Tabla 2):

**Tabla 2.** Cebadores y sondas específicas utilizadas

<b>Virus</b>	<b>Cebador</b>	<b>Sonda</b>	<b>Secuencia</b>
<b>HAV</b>	HAV 68 (FW)		TCA CCG TTT GCC TAG
	HAV 240 (REV)		GGA GAG CCC TGG AAG AAA G
		HAV 150(-)	CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA
<b>NOV GI</b>	QNIF4 (FW)		CGC TGG ATG CGN TTC CAT
	NV1LCR (REV)		CCT TAG ACG CCA TCA TTT AC
		NVGG1p	TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT
<b>NOV GII</b>	QNIF2 (FW)		ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA
	COG2R (REV)		TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
		QNIFs	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG

Para el Master Mix se utilizó el kit Ultrasense one step qRT-PCR system (Invitrogen, USA), 12,5 ul de volumen final: 1X Ultrasense reaction mix, 0,5 pmol/ µl forward, 0,9 pmol/ µl reverse y 0,25 pmol/ µl sonda y 0,625 µl RNA UltraSense (SuperScript III RT, Platinum Taq DNA Polymerase e inhibidor de ribonucleasa RNaseOUT).

El protocolo de ciclamiento fue: 55 °C por una hora Retrotranscripción, 95 °C por 5 minutos precalentamiento; seguida de 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos desnaturalización, 60 °C por un minuto y una extensión final de 65 °C por un minuto utilizando el termociclador LightCycler 96 (Roche, Suiza).

La recta estándar de Hepatitis A se construyó utilizando el virus aislado HM174433c, nucleótidos 68-240, para Norovirus GI nucleótidos 5291-5376 de Norovirus y para Norovirus G2 nucleótidos 5012-5100 de Virus de Lordvale. Ambos controles positivos del Virus de la Hepatitis A y Norovirus G1 y G2 es material certificado de CEFAS & PHE (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science & Public Health England). La concentración

de los estándares de Norovirus G1 es de  $4.80 \times 10^3$  y  $3.10 \times 10^3$  para Norovirus G2, el control blanco fue agua de grado molecular.

La cuantificación viral se realizó trabajando una curva estándar con diluciones decimales seriadas 1:10 por triplicado utilizando el ARN de referencia cuantificado. Los criterios de aceptación son; una pendiente ideal de  $-3,32$  Cq con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) mayor o igual a 0,98. Con esta información se pudo realizar un gráfico de línea recta con la concentración y el Cq.

Para Norovirus G1 la ecuación del gráfico fue  $y = -3,3702x + 41,318$ , luego se halló el número de copias virales utilizando el promedio del ciclo umbral de las repeticiones de la muestra para determinar el eje Y, después “x” para que represente el n en la fórmula  $10^n$  y finalmente se determinó el número de copias.

Para Norovirus G2 se utilizó la ecuación:  $y = -3.43x + 41.504$  (Norma ISO/TS 15216-1:2013).

### **Análisis de resultados**

Se considera una muestra positiva con una amplificación igual o inferior a 40 Cq. El análisis de los resultados en termociclador se realizó con el software LightCycler 96 v.1.01.0.1320 (Roche, Suiza). Los resultados fueron del tipo cualitativo y se utilizó estadística descriptiva: cuadros informativos y tablas de frecuencias con las variables de lugar de expendio, especie de molusco bivalvo y virus.

## RESULTADOS

No se detectó el virus de hepatitis A en las muestras analizadas. El 3,03% (1/33) de muestras fueron positivas para Norovirus G1 y Norovirus G2 con una concentración viral de 3,78 copias genómicas/  $\mu$ l y 222 copias genómicas/  $\mu$ l respectivamente (Tabla 3). La muestra de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) representó el 6,6% (1/15) (Figura 1 y 2, Tabla 4) detectada en la especie y analizada por hepatopáncreas proveniente del terminal pesquero de Ventanilla (Tabla 5).

**Tabla 3.** Carga viral de Norovirus G1 y G2 en la muestra de Concha de Abanico procedente del terminal pesquero de Ventanilla.

Muestra positiva	Fecha de muestreo	NOV G1 Copias/ul	NOV G2 Copias/ul
Concha de Abanico Ventanilla	3/11/19	3,78	222

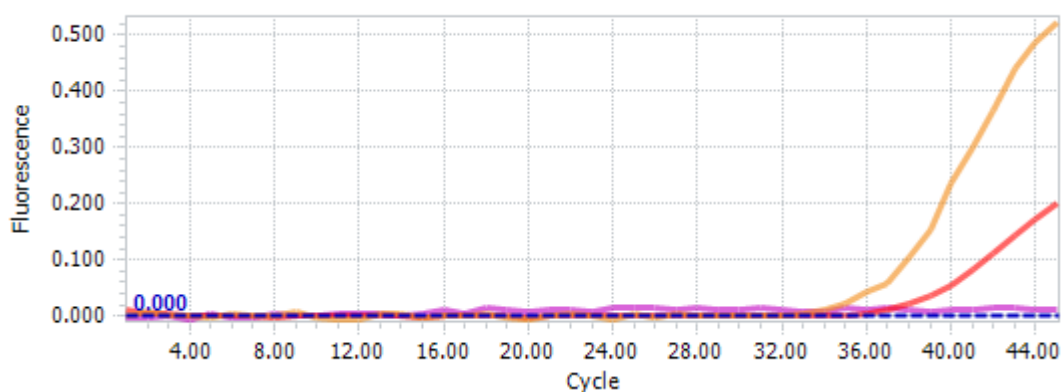
**Tabla 4.** Distribución y porcentaje de muestras positivas para Norovirus G1 y G2, según la especie de moluscos bivalvos adquiridos en los terminales pesqueros de Lima y Callao.

Tipo de molusco	Muestras	HAV		NOV G1		NOV G2	
		Número	%	Número	%	Número	%
Concha de abanico	15	0	0,0%	1	6,6%	1	6,6%
Choro	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Palabritas	3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>	<b>1</b>	<b>6,66%</b>	<b>1</b>	<b>6,6%</b>



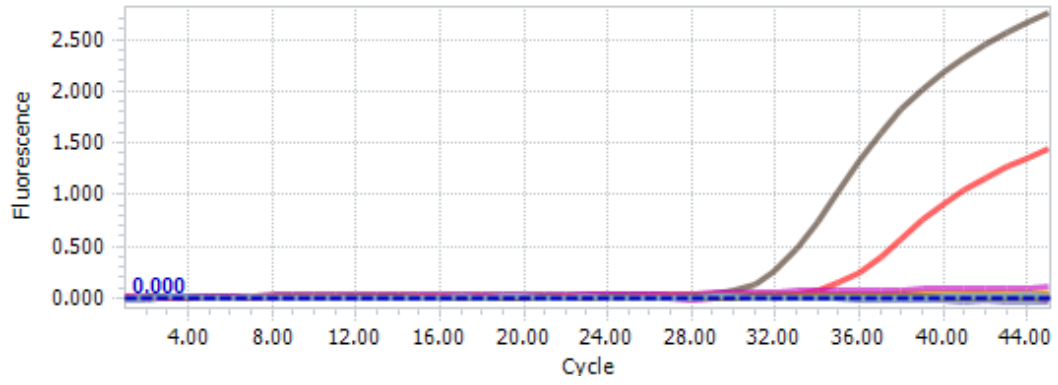
**Tabla 5.** Distribución y porcentaje de muestras positivas para Norovirus G1 y G2, según la ubicación de los terminales pesqueros de Lima y Callao.

Terminal pesquero	Muestras	HAV		NOV G1		NOV G2	
		Número	%	Número	%	Número	%
Minka	9	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ventanilla	6	0	0,0%	1	16,7%	1	16,7%
Breña	6	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Jesús María	6	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Chorrillos	6	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>1</b>	<b>16,7%</b>	<b>1</b>	<b>16,7%</b>



**FIGURA 1.** RT-qPCR de muestras positivas a NOV G1.

**Leyenda:** Naranja: Control positivo. Rojo: Concha de Abanico-Ventanilla 3/11/19. Morado: Control negativo.



**FIGURA 2.** RT-qPCR de muestras positivas a NOV G2.

**Leyenda:** Plomo: Control positivo. Rojo: Concha de Abanico-Ventanilla 3/11/19. Morado: Control negativo.

## DISCUSIÓN

Las aguas residuales que contienen desechos de la actividad humana son la principal fuente de contaminación de microorganismos para el ecosistema marino donde se realiza el cultivo de moluscos bivalvos, los cuales debido a su actividad filtradora dentro de su proceso de alimentación, bioacumulan otras sustancias y microorganismos; y por ello actúan como un vehículo eficiente para la transmisión de virus entéricos principalmente de transmisión fecal-oral, y pueden sobrevivir en mariscos fríos o congelados (Rzezutka y Cook, 2014), por lo que, el problema radica en que estas especies se consumen crudas o ligeramente cocinadas y en algunos casos se ingiere el animal completo, incluidas las vísceras (Fernández, 2013). A pesar de que la zona de cultivo de conchas de abanico es en aguas profundas, la presencia de Norovirus indica que hay contaminación fecal, entre ellos *E. coli*, *Salmonella spp.* y otros virus entéricos mar adentro, por lo que es considerado un peligro para la población el consumo de este alimento.

Aunque existen otros virus entéricos en el agua donde se encuentran los bivalvos pectínidos y no pectínidos, entre estos se encuentran Rotavirus, virus de la hepatitis E, Astrovirus, entre otros. Se decidió realizar la investigación en base a la presencia de hepatitis A y Norovirus porque hay antecedentes de que en Perú se encuentran ambos patógenos en las zonas de cultivo y extracción, igualmente 2 brotes de hepatitis A en España asociados al consumo de palabritas originaron la suspensión de exportación de estos productos (Decisión de ejecución (UE), 2018). En el caso de Norovirus, es el principal causante de brotes de gastroenteritis a nivel mundial (Moreno ,2012), hay estudios recientes que indican la prevalencia de esta enfermedad en la población infantil (Yori et al., 2009; Alvarado *et al*,2012).

El tratamiento de aguas y depuración de mariscos no es suficiente para la eliminación de virus (Bofill-Mas et al, 2005; Blatchley *et al*, 2007). Además, los estándares de calidad

microbiológica como el recuento de coliformes fecales o *E. coli*, no garantizan la ausencia de virus en zonas de cosecha delimitadas por la autoridad sanitaria (Romalde, 2004). Un estudio indica que después de la depuración de mariscos, solo se logró disminuir un pequeño porcentaje de partículas de Norovirus, en comparación con la concentración bacteriana. Asimismo, existe una persistencia en tejidos de ostras (Le Guyader *et al*, 2012) a pesar del proceso de depuración.

La Comisión Europea dispuso la suspensión de la importación de moluscos bivalvos no pectínidos (*Donax spp*) procedentes de Perú, debido a que se detectó un brote de hepatitis A en humanos relacionado al consumo de estos productos en 1999 y posteriormente en 2008. Por lo que se implementó un programa de seguimiento para la detección de VHA en esa especie. En el 2017, la Unión Europea realizó una auditoría en Perú para evaluar el sistema de control existente que rige la producción de moluscos bivalvos destinados a exportación y resolvió mantener la prohibición para su exportación a la UE a los bivalvos no pectínidos y permitiendo la importación de conchas de abanico (Decisión de ejecución UE, 2018). Debido a esta suspensión, es importante realizar una vigilancia y evaluación de análisis de riesgo en las zonas de extracción y de cultivo de no pectínidos, ya que son importantes para los ingresos en el sector de pesca y acuicultura.

Norovirus posee una dosis infectiva muy baja, entre 18 a 1000 partículas virales (Teunis *et al*, 2008). En el caso de individuos enfermos, estos excretan entre  $10^5$  a  $10^9$  partículas/gramo de heces (Fernández, 2013), son extremadamente resistentes, contaminan fácilmente los fómites y sobreviven largos periodos de tiempo tras un evento de contaminación (Lees *et al*, 2000) esto facilita su diseminación mediante la ruta fecal-oral. Se halló la carga viral de Norovirus G1 y G2, que fue de 3,78 copias genómicas/  $\mu$ l y 222 copias genómicas/  $\mu$ l, respectivamente en muestras de hepatopáncreas de concha de abanico, lo que podría causar una gastroenteritis aguda.

La necesidad de analizar muestras representativas es crítica cuando el procedimiento de detección se basa en análisis moleculares de pequeñas cantidades de una muestra cuya contaminación por virus, si es que está presente, es muy baja; siendo un obstáculo incluso en la aplicación de procedimientos de detección altamente sofisticados (Pintó *et al*, 2009).

Mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real no se detectó ninguna muestra positiva al virus de la hepatitis A, a pesar de la alta sensibilidad del método de 10 copias genómicas de RNA / ul. En comparación a este estudio, Chú (2017) detectó 3/6 muestras de agua y de palabritas “*Donax spp*” contaminadas con el virus de la hepatitis A, Marcos *et al* (2014) encontró 2/24 muestras de agua del río Sechura positivas a VHA. Esta diferencia en los resultados está influenciada en la confirmación de que la bahía Mórrope está contaminada, ya que en el lugar desembocan las aguas servidas de la zona, asimismo la gestión de aguas residuales es ineficiente (Ritchie *et al*, 2018). Hellmer *et al* (2014) reportaron la presencia de VHA en desagües de Suecia, encontrando concentraciones de  $14 \times 10^3$  copias de RNA/L de agua servidas y de  $12.4 \times 10^3$  a  $3.2 \times 10^3$  copias de genoma viral/L de agua servidas; y Romalde *et al* (2017) reportaron la detección de VHA en 7.7% de muestras de moluscos con cargas virales de  $4.3 \times 10^2$  a  $4.3 \times 10^6$  en la Ría de Vigo, España. La ausencia de muestras positivas puede ser explicado por la limitada o nula circulación del virus (Moreno *et al*, 2012) o la lejanía de las zonas de cultivo a fuentes de contaminación (Romalde *et al*, 2017). Los bivalvos pasan por procesos de depuración y limpieza, asimismo existe una limitación en el análisis de alimentos debido a la presencia de inhibidores, reduciéndose la cantidad de virus (Fernández, 2013). No obstante, el análisis exclusivo de hepatopáncreas, reduce los inhibidores y los resultados obtenidos son más representativos de la contaminación global (10 o 40 muestras) (Le Guyader *et al*, 2000).

En un estudio de seroprevalencia para hepatitis A en América latina y el Caribe se detectaron anticuerpos en 93,4% de las personas analizadas, durante el periodo 1977-1980; siendo la prevalencia en el Perú de 92,2%, confirmando que la hepatitis A es endémica en la región (Méndez M *et al*, 1980). Hernández *et al* (2015) determinó la frecuencia de hepatitis A en las

ciudades de Lima, Arequipa, Piura, Cajamarca e Iquitos, teniendo una frecuencia de serología global de 50,5%, siendo menor en Lima (37,4%) y mayor en Iquitos (68,7%), concluyéndose que las ciudades estudiadas tienen un patrón de endemicidad intermedio.

En cuanto a los resultados de Norovirus G1 y G2, se detectó una muestra positiva de concha de abanico para ambos genogrupos proveniente del terminal pesquero de Ventanilla, a diferencia de Fernández *et al* (2013) que detectaron 18 muestras positivas de 160 moluscos bivalvos de diferentes especies. Por otro lado, Moreno *et al* (2012) detectaron 76 muestras positivas a Nov G1 de 329 muestras de moluscos como mejillones, conchas finas, chirlas y almejas de carril en Granada, España. Romalde *et al* (2017) reportaron una prevalencia de 25.6% para NOV G1 con cargas de  $<7 \times 10^1$  a  $4.4 \times 10^4$  /g de tejido digestivo y para NOV G2 34.6% de prevalencia, encontrando cargas de  $<5 \times 10^1$  -  $4.6 \times 10^4$  de tejido digestivo. La discrepancia en los resultados de este estudio con investigaciones de otros países se debe a la gran diferencia en el número de muestras, asimismo el aumento de muestras positivas puede deberse a la estación del año en que fueron tomadas, en verano la probabilidad de encontrar Norovirus es 2.8 veces mayor que en invierno, debido a que hay un aumento en la concentración de virus excretado por la población en las aguas en las cuales crecieron los bivalvos (Moreno *et al*, 2012). La diferencia entre la carga viral de Norovirus genogrupo 1 y 2 se debe a que el primero se encuentra en mayores concentraciones en las aguas residuales, empero Norovirus G1 tiene una mayor resistencia al tratamiento de aguas residuales por lo que del mismo modo está presente en moluscos bivalvos contaminados (Fernández *et al*, 2013). Factores como la presencia de Norovirus en aguas residuales, el estado sanitario de los terminales pesqueros, así como la contaminación a través de los manipuladores de estos productos deben ser considerados.

Alvarado *et al* (2012) detectaron infecciones en niños por norovirus entre 17,4 y 35% mediante RT-PCR en Perú. Además, Ramos *et al* (2015) reportaron un brote de Norovirus en un centro de entrenamiento militar peruano, encontrando 13 muestras de heces positivas a NOV G2 por RT-PCR, con una tasa de ataque de 45,2%.

La Guía para la Prevención y el Control de brotes de gastroenteritis causados por Norovirus en ajustes de la Salud presentado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) aborda medidas de prevención, control y manejo de brotes causados por Norovirus en instituciones de salud y en entornos no sanitarios; esta guía es de mucha ayuda para el diagnóstico y control de la enfermedad, debido a que en los hospitales el diagnóstico es subestimado y no realizan un seguimiento a los pacientes, y por ende, es difícil determinar la prevalencia real de Norovirus y de Hepatitis A, al igual que otras enfermedades virales en Perú (Center for Disease Control and Prevention).

Se determinó que las ostras acumulan selectivamente varias cepas de Norovirus mediante ligandos de carbohidratos, facilitando su bioacumulación y persistencia en los mariscos; la cantidad de partículas virales acumuladas está influenciada por la especie de molusco bivalvo. Para comprender el rol de los ligandos, es necesario contar con métodos que describan la diversidad viral en moluscos. Esto supone realizar investigaciones exhaustivas sobre el comportamiento y la actividad filtradora de los moluscos bivalvos frente a patógenos virales (Le guyader *et al*, 2012).

Norovirus se excreta en altas concentraciones por individuos infectados. La concentración de este virus en aguas residuales suele ser alta, sin embargo, en ambientes sin brotes, las concentraciones de los virus entéricos son bajas (Strubbia *et al*, 2019). A pesar de la dificultad de identificar a Norovirus G4, debido al pequeño número de secuencias disponibles en GenBank (Strubbia *et al*, 2019), se podría utilizar un método más específico como la secuenciación metagenómica para la determinación de cepas de Norovirus. (Strubbia *et al*, 2019). Así como la presencia de virus emergentes que pueden ser una amenaza a la salud pública en el futuro, ya que se está desestimando la investigación de virus nuevos.

Es la primera investigación que se realiza en moluscos bivalvos expedidos de mercado, con lo cual se puede determinar el estado en el cual llegan estos productos hidrobiológicos al consumidor final, según CEFAS (Centro de Ciencias del Medio Ambiente, Pesca y Acuicultura), el solo hecho de que el virus esté presente, ya es un riesgo de enfermedad para el ser humano. Por otro lado, el cumplimiento de las normas debe ser verificada, ya que en Perú el sector pesquero y acuícola junto con la comercialización es informal representando un peligro para el consumidor. No se pudo determinar la zona de cultivo o de extracción donde fueron obtenidos estos bivalvos, lo que genera dificultad para precisar la trazabilidad de estos, sin embargo, es importante los estudios de análisis de riesgo que abarquen toda la cadena productiva, la comercialización y la vigilancia de Norovirus y hepatitis A en hospitales y clínicas.

La investigación reporta la presencia de Norovirus G1 y G2 en concha de abanico en el terminal pesquero de Ventanilla; lo que representa información que permite valorar el riesgo de contaminación a humanos debido al consumo de moluscos bivalvos. Igualmente, es necesario conseguir la mejora de la seguridad alimentaria de mariscos y evaluar el impacto que tienen las enfermedades gastrointestinales causadas por virus en la salud pública.



## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios periódicos de moluscos procedentes de mercados y zonas de cultivo para consumo interno, teniendo en cuenta factores como las estaciones del año, condiciones sanitarias de los mercados, mayor número de muestras y procedencia de las muestras; con el propósito de evaluar la magnitud real de la contaminación viral.
- Realizar estudios epidemiológicos de Norovirus y hepatitis A en la población y determinar si la frecuencia de la enfermedad está asociada al consumo de mariscos, agua, verduras y frutas contaminadas.
- Desarrollar estudios de metagenómica en muestras de agua y moluscos bivalvos para identificar y detectar virus emergentes.
- Realizar investigaciones sobre la filogenética de Norovirus y hepatitis A en moluscos bivalvos y muestras ambientales.
- Realizar estudios sobre análisis de riesgos en moluscos bivalvos no pectínidos.
- Es sugerente elaborar estudios de nuevas estrategias de depuración en moluscos bivalvos más consumidos en la región que garanticen la eliminación del virus en el organismo.

## CONCLUSIONES

- No se detectó ninguna muestra positiva al virus de la hepatitis A mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real.
- Se detectó una muestra de Concha de Abanico positiva a Norovirus genogrupo 1 y genogrupo 2, mediante la prueba RT-PCR en tiempo real, proveniente del terminal pesquero de Ventanilla.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado L, Castillo W. Gastroenteritis por norovirus en Lima. Rev. Med Hered [Internet]. 2012 Mar [citado 2020 mayo 12]; 23(1): 72-72. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2012000100016&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000100016&lng=es).
- Bernedo D, Gomez H, León H, Quispe J. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017.2018. Ministerio de la producción [PRODUCE][Dataset]. Versión Diciembre 2018.Recuperado de: <http://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/825-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2017>
- Blatchley E, Gong W, Alleman J, Rose J, Huffman D, Otaki M, Lisle J, Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. Water Environ. Res.2007; 79:81-92.
- Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Albiñana-Giménez N, Maluquer de Motes C, Hundesa A, Girones R. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. Rev. Esp. Salud Pública.2005;79(2): 253-269.
- Centre for Disease Control and Prevention [CDC]. Guideline for the prevention and control of Norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings.2011. 52 p.

- Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science [CEFAS]. Monitoreo Microbiológico de Áreas de Producción de Moluscos Bivalvos Guía para las Buenas Prácticas: Aplicación Técnica.2010
- Chú E. Detección de Hepatitis A y Norovirus GI y GII en muestras de agua de mar y moluscos bivalvos de las bahías de Mórrope y Sechura, mediante la técnica RT-PCR en tiempo real. (Tesis para titulación) Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017.
- Conaty, S, Bird P, Bell G, Kraa E, Grohmann G, McAnulty J. Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiol. Infect.*2000.;124:121-130.
- Costafreda M, Bosch A, Pintó R. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied Environmental Microbiology.*2006; 72:3846-3855.
- Da Silva A, Le Saux J, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader F. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Applied Environmental Microbiology.*2007; 24:7891-7897
- Decisión de ejecución (UE) 2018/1583 de la comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, L 263/71, (22/10/2018) España.
- Dirección General de Salud Ambiental [DIGESA]. Protocolo de Monitoreo de la Calidad Sanitaria de Recursos Hídricos Superficiales.2007; 14 p.

- D.S.007-2004-PRODUCE Norma Sanitaria de Moluscos Bivalvos Vivos. 2004.Perú.
- Fernández. Detección de Norovirus y Virus de la Hepatitis A en moluscos y muestras clínicas. Genotipado y estudio poblacional. (Tesis para doctorado en Biología). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela;2013.
- Fisher, W. Structure and functions of oyster hemocytes. Immunity in invertebrates. Springer-Verlag, Berlin. 1986.En: M. Breheling (ed.) pp. 25-35.
- Hellmer M, Paxéus N, Magnius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, Bergstrom B, Norder L. 2014. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. Applied and Environmental Virology 80 (21): 6771- 6781
- Hernández R, Chaparro E, Díaz C, Carbajal M, Cieza É, Cerpa R. Frecuencia de hepatitis a en niños y adolescentes de cinco ciudades del Perú. Rev. peru. med. exp. salud pública [Internet]. 2015 Jul [citado 2019 Jun 27]; 32(3): 499-503. Disponible en:
- Le Guyader F. Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. Applied and Environmental Microbiology.2000;66:3241-3248.
- Lee R, Lovatelli A, Ababouch L. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos.FAO.2010;511:153p.

- Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 59:81-116.
- Loisy F, Atmar R., Guillon P, Le Cann, P, Pommepuy M., Le Guyader, F. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 2005;123:1-7
- Marcos A, Gómez-Sánchez M, Hung A. Detección del virus de la hepatitis A en dos muestras de agua del Río Sechura, usando transcriptasa-reversa PCR en tiempo real. *Salud tecnol. vet.*2014; 2:1-6.
- Mayoral J, Mateo A, Pons M, Herrera I, Gutiérrez G, Vivo A. Brote de gastroenteritis en una residencia de ancianos de Albacete. *Rev Esp Salud Pública.*2000; 74:561-72.
- Méndez L, Arce M, Kruger H, Sánchez S. Prevalencia de marcadores serológicos de Hepatitis vírica en diversos grupos de población del Perú. *Bol. Of Sanit Panam.*1989;106(2).
- Moreno E. Prevalencia de norovirus en moluscos bivalvos y su relación con indicadores de contaminación [tesis doctoral]. Granada: Editorial de la Universidad de Granada, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.2012.
- Murray P, Rosenthal K. *Microbiología médica*. 6a ed. España:Elsevier;2009.
- Norma ISO/TS 15216-1. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de virus de la hepatitis A y norovirus en alimentos utilizando RT-PCR en tiempo real. Parte 1: Método para la determinación cuantitativa.*2013

- Norma ISO/TS 15216-2. Microbiology of food and animal Feed-Horizontal methods for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real time RT-PCR. 2013.Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud [OMS] Hepatitis A.2019
- Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE] Vigilancia de la Sanidad de los animales acuáticos.2019
- Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of the hepatitis A virus strains recovered from the environment and from acute hepatitis patients. J Gen Virol.2001; 82:2955-63.
- Pintó R, Costafreda I, Bosch A. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. Appl. Environ Microbiol.2009;75(23):7350-7355.
- Ramos M, Soto G, Loayza L, Valle R, Luna G, Gonzalez S. Brote de infección por norovirus del Grupo II en un centro de entrenamiento militar, Perú 2013. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2015 Ene [citado 2020 Mayo 12]; 32( 1 ): 87-92. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000100013&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000100013&lng=es).
- Resolución Directorial N° 006-2017-SANIPES-DSNPA.Perú.

- Ritchie A, Hung A, Gómez-Sánchez M. Detección de Norovirus GI Y GII en muestras de agua del Río Piura mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. *Salud tecnol.vet.*2018;2:47-54.
- Romalde J, Area E, Sánchez G, Ribao C, Torrado I, Abad X. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int J Food Microbiol.*2002;74:119-130.
- Romalde J. Contaminación de moluscos por virus entéricos: validez de los estándares legales y microorganismos indicadores. SIIC. [Internet].2004.
- Romalde J, Rivadulla E, Varela M, Barja J. An overview of 20 years of studies on the prevalence of human enteric viruses in shellfish from Galicia, Spain. 2017 *Journal of Applied Microbiology* 124, 943-957.
- Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:441-53
- Sánchez G, Pinto R, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.*2002; 40:4148-4155.
- Strubbia S, Phan M, Schaeffer J, Koopmans M, Cotten M, Le Guyader F. Characterization of Norovirus and Other Human Enteric Viruses in Sewage and Stool Samples Through Next-Generation Sequencing. *Food and Environmental Virology.*2019.



- Strubbia S, Schaeffer J, Oude B, Besnard A, Phan M, Nieuwenhuijse D, de Graaf M, Schapendonk C, Wacrenier C, Cotten M, Koopmans M, Le Guyader F. Metavirome Sequencing to Evaluate Norovirus Diversity in Sewage and Related Bioaccumulated Oysters. *Front. Microbiol.*2019; 10:2394.
- Teunis P, Moe C, Liu P, Miller S, Lindesmith L, Baric R, Le Pendu J, Calderon R. Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of Medical Virology.* 2008; 80:1468-1476.
- Tripp M. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*1960;19:210-223.
- Vaidya S, Chitambar S, Arankalle VA. Polymerase Chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* 2002; 37: 131-6.
- Vilariño L. Prevalencia de virus entéricos en moluscos cultivados en Galicia, estudio de la fiabilidad de microorganismos indicadores de contaminación viral [tesis doctoral]. España: Universidad Santiago de Compostela, Facultad de Biología;2009
- Yori P, Schwab K, Gilman R, Nappier S, Portocarrero D, Black R. highly prevalent cause of endemic acute diarrhea in children in the peruvian amazon. *J Pediatr Infect Dis.*2009;28(9):844-847.