

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“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 optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Erick Chú Perea

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2017

*Este trabajo va dedicado
con mucho amor y cariño a Galia y
a mis hijos Gareth y Maitena.*

Muy agradecido con mi alma Mater la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por la formación como médico Veterinario Zootecnista, al Laboratorio de Biología Molecular y al Proyecto “Monitoreo y caracterización de la contaminación ambiental de ecosistemas acuáticos y su impacto en la sanidad y producción de moluscos bivalvos en la costa norte del Perú” N° 134-PNICP-PIAP-2015 financiado por el programa Innóvate Perú - PRODUCE, gracias por el financiamiento para poder realizar este trabajo.

Gracias al Dr. Armando Hung por permitirme ser parte del equipo en el proyecto, a la Blga. Marcela Mora por ser mi mentora en todo el proceso, a Lizbeth Marilyn Lazo por el acercamiento que me brindó a la tesis y el apoyo administrativo incondicional.

Eternamente agradecido con mis padres Meche y Pocho.

ABSTRACT

In Peru, one of the main activities carried out in the aquaculture sector is the cultivation and extraction of bivalve molluscs, which during the last decade have been seriously affected by the contamination of rivers and seas. Currently, Peru has been restricted from exporting certain bivalve molluscs by the European Union, such as *Donax spp.* "palabritas", *Ensis Macha* "navaja" and *Transenella Pannosa* "almeja", due to outbreaks of Hepatitis A in Spain in the year 2008. Therefore, this paper aims to monitor the presence of Hepatitis A and Norovirus GI & GII in seawater and *Donax spp.* at the bays of Morrope and Sechura, where most of the production of bivalve molluscs of the country takes place. For this paper, 139 samples of seawater and 6 samples of palabritas were taken between February 2016 and February 2017, then they were analyzed by real-time RT-PCR. 3 samples came out positive for Hepatitis A and 9 to Norovirus GII. Results show the need for a more extensive monitoring plan for the control of health security and safety of bivalve molluscs products intended for trade or processing for human consumption.

Key words: Morrope, bivalve molluscs, Norovirus GI & GII, real-time RT-PCR, Sechura, Hepatitis A virus.

RESUMEN

En el Perú, una de las principales actividades realizadas en el sector acuícola es el cultivo y extracción de moluscos bivalvos, que a lo largo de la última década se ha visto seriamente afectada por la contaminación de ríos y mares. Actualmente, el Perú tiene restringido la exportación de ciertos moluscos bivalvos por parte de la Unión Europea, como *Donax spp* “palabritas”, *Ensis macha* “navaja” y *Transenella pañosa* “almeja”, atribuidos a los brotes del virus de Hepatitis A en España en el año 2008. Por tal motivo, el presente estudio tuvo por objetivo detectar la presencia de Hepatitis A y Norovirus GI y GII en agua de mar y *Donax spp*. “palabritas” en las bahías de Mórrope y Sechura, donde se concentra gran parte de la producción de moluscos bivalvos del país. Para el estudio se tomaron 139 muestras de agua de mar y 6 muestras de palabritas entre los meses de febrero 2016 a febrero 2017 y se analizaron mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, donde se obtuvo 3 muestras positivas a Hepatitis A y 9 muestras positivas a Norovirus GII. Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de llevar un plan de vigilancia más exhaustivo para el control de la seguridad sanitaria e inocuidad de los productos moluscos bivalvos destinados directamente al comercio o a su procesamiento para el consumo humano.

Palabras claves: Mórrope, moluscos bivalvos, Norovirus GI y GII, RT-PCR en tiempo real, Sechura, virus de Hepatitis A.

INTRODUCCIÓN

El virus de Hepatitis A (HAV) y Norovirus (NoV), son agentes importantes en las enfermedades virales humanas transmitidas por alimentos contaminados. Para la detección de estos virus existen técnicas moleculares como la transcriptasa inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El virus de la Hepatitis A (HAV), pertenece a la familia Picornaviridae, es un virus pequeño (60-70 nm), su genoma está constituido por ARN monocatenario. La enfermedad está estrechamente asociada a la falta de agua salubre, un saneamiento deficiente y una mala higiene personal (OMS, 2016).

Norovirus (NoV), anteriormente llamado Norwalk-like Virus (NLV), tiene un diámetro aproximado de 27 a 28 nm, pertenece a la familia Caliciviridae y se considera el principal agente viral asociado con gastroenteritis epidémica y esporádica no bacteriana en personas de todas las edades, teniendo especial consideración en niños y ancianos alrededor del mundo. Su genoma está constituido por ARN de cadena simple positivo y un tamaño aproximado de 7,5 kb (Ando *et al.*, 1995).

En el 2008, el sistema de Alerta Rápida para Alimentos Piensos (RASFF) de la Comisión Europea dispuso la alerta sanitaria contra los productos peruanos. Esto debido a que el Servicio de Salud Pública de la Comunidad de Valencia (España) detectó un brote de intoxicación alimentaria con virus de Hepatitis A como consecuencia de la ingesta de moluscos bivalvos (*Donax spp.*) congelados procedentes de Perú. El mismo año la Dirección General de Salud y Protección de los Consumidores de la Unión Europea (DG-SANCO), dispuso la prohibición de las importaciones de moluscos bivalvos provenientes de Perú en todos los países que conforman la Unión Europea. (Decisión 2008/866/CE).

En el Perú se han realizado escasos estudios sobre contaminación ambiental e identificación de enterovirus, *Marcos et al.* (2014) detectaron el virus de Hepatitis A en aguas del río Sechura – Piura durante los meses de mayo – agosto del 2013, donde reportaron dos muestras positivas a Hepatitis A. *Ritchie* (2015), detectó Norovirus GI y GII, en las zonas norte, sur y puente del río Sechura en los meses de mayo a septiembre del 2013.

Por su parte, *Guambo* (2009) detectó y genotipificó Norovirus GI y GII en muestras de heces de niños menores de 5 años que presentaban episodios esporádicos de diarrea aguda en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas, Ecuador, donde 244 muestras de materia fecal, reportando 72 muestras positivas a Norovirus, 12 para GI, 53 para GII y 7 para una infección mixta (GI/GII). Claramente indica que el genotipo predominante en su estudio fue el GII, siendo el responsable del 73,61% del total de los casos positivos.

Romalde, et al. (1994); considera que los moluscos bivalvos han sido implicados como vectores en la transmisión de enfermedades entéricas durante muchas décadas. Estas apariciones periódicas de enfermedades entéricas han ocasionado que los consumidores desconfíen con respecto a la seguridad de los mariscos, lo que se traduce como importantes pérdidas económicas. El virus de Hepatitis A es tal vez la enfermedad viral más grave transmitida por la ingestión de mariscos crudos o cocidos contaminados. Se han desarrollado una serie de métodos inmunoquímicos directos para la detección de virus, sin embargo, la mayoría de estos procedimientos han sido incapaces de detectar niveles bajos de partículas virales en los mariscos como sucede en muestras ambientales.

Las normas que regulan el desarrollo de la actividad acuícola se emiten en armonía con la conservación del medio ambiente y la biodiversidad. El Estado Peruano protege la conservación de los bancos naturales, para lo cual aplica políticas de gestión ambiental que garanticen su preservación. Con éste propósito el Ministerio de la Producción establece Comités de Gestión Ambiental encargados de proponer los programas de gestión integral. El Reglamento de la Ley de Promoción y Desarrollo de la Acuicultura, establece las condiciones del aprovechamiento

responsable de los recursos de los bancos naturales para las actividades artesanales y de acuicultura (*Cavero y Rodríguez, 2008*).

Conociendo la problemática, estudios como estos son de gran importancia para dar a conocer la situación actual de nuestro país en el sector acuícola. Con los resultados obtenidos las autoridades competentes deben concientizar a la población sobre la situación precaria que vive el Perú por la falta de cultura hacia el agua, la población debe conocer los riesgos que conllevan el tener malas condiciones sanitarias, malas prácticas de higiene y hábitos alimenticios. Para eso se debe trabajar en políticas de salud pública que ayuden a prevenir y no a curar, así, todos estaríamos informados de los riesgos potenciales que ponen en alerta a cualquier zona vulnerable de nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y colección

Se seleccionaron los siguientes puntos de muestreo:

Mórrope:

Mórrope 5	06°43'52.9" Latitud Sur	080°00'28.9" Longitud Oeste
Dren	06°44'18.2" Latitud Sur	079°59'55.2" Longitud Oeste

(Anexo 1)

Las muestras de agua de mar se tomaron durante un periodo de 6 meses (junio – noviembre 2016) en botellas plásticas estériles de 1 L. La extracción de “palabritas” (*Donax sp.*) fue mediante redes. Ambos muestreos fueron mensuales durante el mismo periodo indicado.

Sechura:

Estación San Pedro	05°31'06.1" Latitud Sur	80°53'45.0" Longitud Oeste
Estación Chulliyaku	05°35'31.6" Latitud Sur	80°52'00.5" Longitud Oeste
Estación Puerto Rico	05°49'15.2" Latitud Sur	81°02'08.4" Longitud Oeste
Estación Parachique	05°46'20.1" Latitud Sur	80°52'02.3" Longitud Oeste
Estación las Delicias	05°43'26.5" Latitud Sur	80°51'23.8" Longitud Oeste
DREN Sechura	05°33'16.4" Latitud Sur	80°49'36.3" Longitud Oeste

(Anexo2)

Se recolectaron muestras de agua de mar durante un periodo de 13 meses (febrero 2016 – febrero 2017) y con una frecuencia quincenal.

Las muestras fueron transportadas en coolers con gel packs al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UPCH; siguiendo la cadena de frío entre 0 a 6 °C.

Concentración viral y extracción de ARN en muestras de agua mar y moluscos bivalvos

La concentración viral se realizó según las Especificaciones Técnicas de la ISO/TS 15216-2:2013, utilizando 1 litro de agua de mar como volumen inicial de muestra y entre 40 a 50 unidades de “palabritas”.

Las muestras de agua fueron filtradas con un sistema al vacío (Manifold- Rocker, Taiwan), empleando una membrana cargada positivamente con poros de 0.45 µm. La membrana se colocó en un tubo Falcon de 50 ml con 4 ml de TGBE buffer, se añade 10 ml de TGBE buffer a la botella vacía y se sometió a agitación a 500 oscilaciones/minuto por 20 minutos. El contenido de la botella se incorporó al tubo Falcon con el filtro. Se corrigió el pH a 7,0 con 0,1 mol/L de Ácido clorhídrico (HCl) y se centrifugó a 4000 x g por 15 minutos. El concentrado obtenido se ajustó con PBS a un volumen final de 500 µl y se almacenó en congelación hasta la extracción de ARN.

Para trabajar con moluscos bivalvos “palabritas” se aisló el hepatopáncreas de cada individuo, se homogenizó, se pesaron 2g y se incubó a 37 °C x 320 oscilaciones/minuto durante 60 minutos con 2 ml de proteinasa K (30U/mg), seguido de una incubación de 15 minutos a 60 °C. Se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos, se colectó el sobrenadante para la extracción de ARN. Como control de proceso de extracción se inoculó 10 µl de Mengovirus (Ceeram tools, Francia) en la muestra. La extracción de ARN se realizó con el kit Nuclisens MiniMag (Biomérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección de HAV y Norovirus por RT-PCR en tiempo real

Se empleó el kit comercial RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen - USA). Para la detección del virus de Hepatitis A se emplearon los primers HAV68 5`TCACCGCCGTTTGCCTAG 3`, HAV240 5`GGAGAGCCCTGGAAGAAAG3` y HAV 150 (Sonda) FAM 5`CCTGAACCTGCAGGAATTAA3`MGBNFQ (*Costafreda et al., 2006*). Para Norovirus GI se empleó QNIF4 5`CGCTGGATGCGNTTCCAT 3` (*Da Silva et al., 2007*), NV1LCR 5`CCTTAGACGCCATCATCATTAC3`, y NVGG1p (Sonda) FAM 5`TGGACAGGAGAYCGCRATCT3`TAMRA (*Svraka et al, 2007*). Para Norovirus GII se empleó las secuencias QNIF2 5`ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA3` (*Loisy et al, 2005*), COG2R 5`TCGACGCCATCTTCATTCACA3` (*Kageyama et al., 2003*), y la QNIFs (Sonda) FAM 5`AGCACGTGGGAGGGCGATCG3`TAMRA (*Loisy et al., 2005*).), Se trabajó con un volumen final de 25 µl; 5 µl reaction mix (Invitrogen – USA), 0.5 pmol/µl forward, 0.9 pmol/µl reverse, 0.25 pmol/µl probe y enzima 1.25 µl. La transcripción reversa fue de 55°C por una hora, seguido de 95°C por un minuto, 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por un minuto y una extensión final de 65°C por un minuto.

RESULTADOS

El control del proceso de extracción (Mengovirus) fue mayor al 1% en todas las muestras, indicando la correcta extracción de ARN y así evitar falsos negativos.

Los meses de mayor presencia viral fueron entre julio y noviembre (Cuadro 1 y figura 1), encontrándose bajas concentraciones de Norovirus GII (42,76 copias μl^{-1}) a diferencia del virus de Hepatitis A que se encontraron concentraciones mayores a 15149,15 copias μl^{-1} (Cuadro 1). Tres (2%) del total de muestras analizadas resultaron positivas a Hepatitis A; y nueve (6%) positivas a Norovirus GII.

En las muestras de palabritas (*Donax spp*) de Mórrope, agua de mar del punto Dren Mórrope (Cuadro 1 y figura 1) y Puerto Rico (Sechura) (Cuadro 4 y figura 1) se detectó la presencia del virus de Hepatitis A. Los resultados positivos a Norovirus GII fueron en agua de mar del punto Dren Mórrope del 11 de junio del 2016 (Cuadro 3 y figura 1), de Puerto Rico (Sechura) del 03 de julio del 2016 (cuadro 6, figura 2 y 3), Dren Mórrope del 25 de septiembre del 2016 (Cuadro 3 y figura 1), Mórrope 05 del 25 de septiembre del 2016, en palabritas (*Donax spp*) de Mórrope del 25 de septiembre del 2016 y del 30 de octubre del 2016; en agua de mar del punto Dren Sechura del 05 de noviembre del 2016 (Cuadro 6, figura 2 y 3), Mórrope 05 del 27 de noviembre del 2016 y palabritas (*Donax spp*) de Mórrope del 27 de noviembre del 2016 (Cuadro 3, figura 2 y 3). No se obtuvo amplificación para Norovirus GI en ninguna muestra.

**Cuadro 1.- Resultados de la detección del virus de Hepatitis A en la Bahía de Mórrope
entre los meses de junio a noviembre del 2016**

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo					
	11-jun	23-jul	21-ago	25-sep	30-oct	27-nov
Dren Mórrope	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Mórrope 05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Palabritas	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Cuadro 2.- Resultados de la detección de Norovirus GI en la Bahía de Mórrope entre los
meses de junio a noviembre del 2016**

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo					
	11-jun	23-jul	21-ago	25-sep	30-oct	27-nov
Dren Mórrope	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Mórrope 05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Palabritas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Cuadro 3.- Resultados de la detección de Norovirus GII en la Bahía de Mórrope entre los
meses de junio a noviembre del 2016**

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo					
	11-jun	23-jul	21-ago	25-sep	30-oct	27-nov
Dren Mórrope	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Mórrope 05	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Palabritas	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Cuadro 4.- Muestras positivas al virus de Hepatitis A en la Bahía de Sechura entre los meses de febrero del 2016 a febrero del 2017

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo													
	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	
San Pedro	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Chuliyachi	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Parachique	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Puerto Rico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo^a
Las Delicias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Dren Sechura	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

a : Fecha de muestreo 12 de febrero del 2017

Cuadro 5.- Resultados de la detección de Norovirus GI en la Bahía de Sechura entre los meses de febrero del 2016 a febrero del 2017

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo												
	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb
San Pedro	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Chulliyachi	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Parachique	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Puerto Rico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Las Delicias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Dren Sechura	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cuadro 6.- Resultados de la detección de Norovirus GII en la Bahía de Sechura entre los meses de febrero del 2016 a febrero del 2017

Puntos de Muestreo	Fecha de Muestreo												
	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb
San Pedro	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Chuliyachi	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Parachique	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Puerto Rico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Las Delicias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Dren Sechura	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo^b	Negativo	Negativo	Negativo

a : Fecha de muestreo 03 de julio del 2016

b : Fecha de muestreo 05 de noviembre del 2016

Cuadro 7.- Cuantificación de la carga viral en muestras positivas al virus de Hepatitis A

Muestras Positivas Hepatitis A	Fecha de toma de muestra	Cp*	Copias de ARN/μl
Dren Mórrope	25.09.2016	38.6	71.41
Puerto Rico-Sechura	12.02.2017	34.03	1717.17
Palabritas	23.07.2016	29.38	43658.87

*Ciclo de cuantificación

Cuadro 8.- Cuantificación de la carga viral en muestras positivas Norovirus GII

Muestras Positivas Norovirus GII	Fecha de toma de muestra	Cp*	Copias de ARN/μl
Dren Mórrope	11.06.2016	35.77	68.95
Puerto Rico – Sechura	03.07.2016	36.79	33.55
Dren Mórrope	25.09. 2016	34.92	125.68
Mórrope 05	25.09.2016	36.93	30.39
Palabritas – Mórrope	25.09.2016	38.46	10.31
Palabritas – Mórrope	30.10.2016	37.12	26.57
Palabritas – Mórrope	27.11. 2016	37.73	17.27
Dren Sechura	05.11.2016	36.19	51.25
Mórrope 05	27.11. 2016	37.46	20.90

*Ciclo de cuantificación

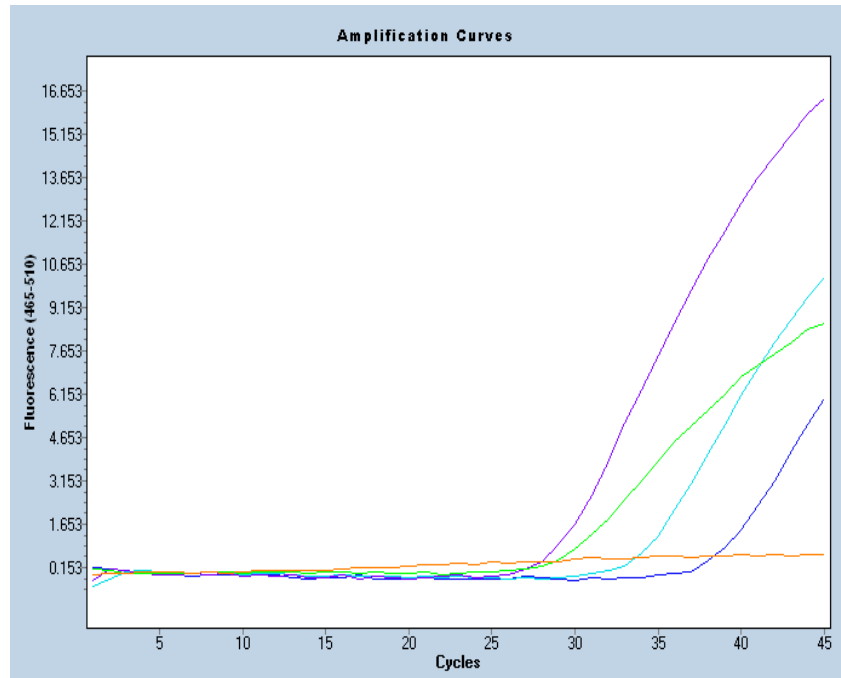


Figura 1.- RT PCR en tiempo real de muestras positivas a HAV. Morado: control positivo; Verde: palabritas Mórrope 23.07.2016; Turquesa: Puerto Rico – Sechura 12.02.2017; Azul: Dren Mórrope 25.09.2016; Naranja: control negativo

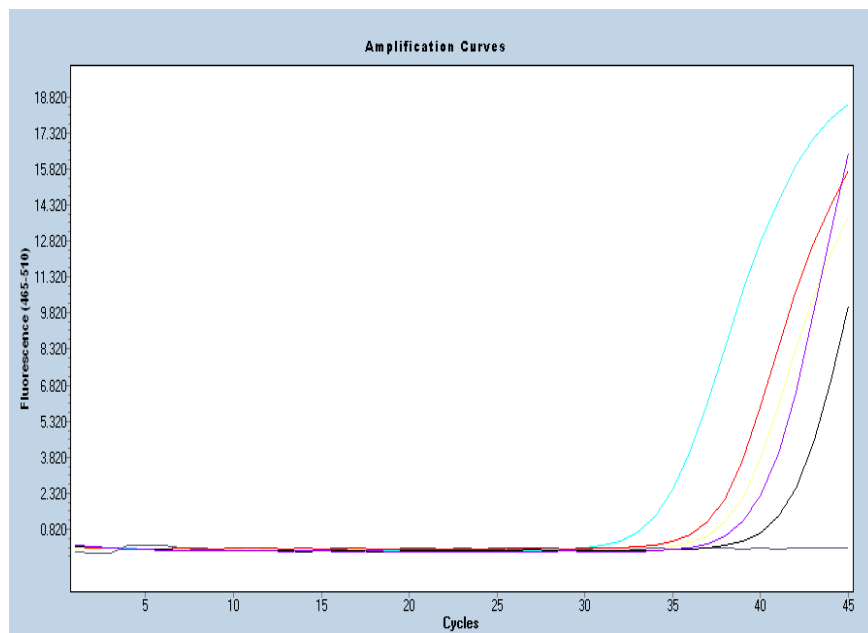


Figura 2.- RT-PCR en tiempo real de muestras positivas a Norovirus GII. Turquesa: control positivo; Rojo: Dren Mórrope 11.06.2016; Amarillo: Dren Mórrope 25.09.2016; Morado: palabritas Mórrope 30.10.2016; Negro: palabritas Mórrope 27.11.2016; Gris: control negativo

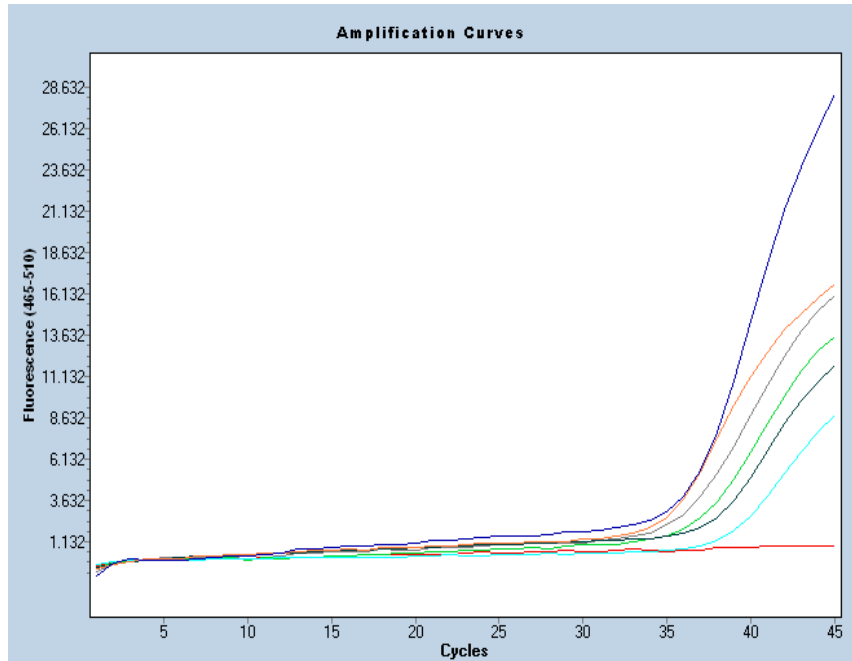


Figura 3.- RT-PCR en tiempo real de muestras positivas a Norovirus GII. Azul: control positivo; Naranja: Puerto Rico – Sechura 03.07.2016; Gris: Mórrope05 25.09.2016; Verde: Dren Sechura 05.11.2016; Verde oscuro: Mórrope 05 27.11.2016; Turquesa: palabritas Mórrope 25.09.2016; Rojo: control negativo.

DISCUSIÓN

En la bahía de Mórrope se detectó virus de Hepatitis A en “palabritas” (*Donax spp*) colectadas el 23 de julio del 2016, esto es un indicador de contaminación en la bahía; el foco de contaminación se detectó con una muestra positiva a Hepatitis A en el punto Dren Mórrope y Norovirus GII, donde desemboca las aguas servidas de la zona, lo cual representa un riesgo para la salud pública al ser una zona recreacional y de extracción de moluscos bivalvos. Las otras muestras tomadas en diferentes fechas de los mismos puntos fueron negativas, de ese modo indicando una presencia irregular de Hepatitis A y Norovirus GII en este estudio.

En la Bahía de Sechura se detectó únicamente Norovirus GII, sin embargo, Ritchie (2015) realizó un estudio en muestras de agua del río Sechura donde detectó Norovirus GI, lo cual evidencia la necesidad de seguir monitoreando la zona constantemente y tener conocimiento *in situ* del grado de contaminación de esta bahía por ambos grupos de Norovirus.

En el periodo que se realizó este trabajo, paralelamente se realizaron análisis microbiológicos de las bahías de Mórrope y Sechura, reportando niveles considerables de *E. coli* y coliformes fecales en los puntos Chulliyachi, Puerto Rico, Dren Sechura, Dren Mórrope y Mórrope 05, llegando a reportar niveles por encima de 1000 NMP index/100ml. Esto se relaciona con los resultados del presente estudio, estando los virus de Hepatitis A y Norovirus GI y GII presentes en heces y siendo la ruta fecal – oral la forma de contraer estos enterovirus.

En Ecuador, Guambo, (2009) reportó 74% de prevalencia para Norovirus GII y 17% para Norovirus GI, en niños menores de 5 años y consideró que ciertos factores pueden contribuir al surgimiento de estos brotes como son, las condiciones sanitarias precarias, pobres hábitos higiénicos, escasas de ventilación, fluctuaciones en la temperatura y humedad en la vivienda. Se

observa concordancia con las condiciones sanitarias precarias en la zona de Mórrope donde las letrinas se encuentran cercanas al dren que desemboca al mar.

Las restricciones de la Unión Europea a causa de los brotes de Hepatitis A en el año 2008, han llevado a ejecutar un “plan de acción” para el levantamiento de las observaciones por parte de la autoridad competente a través de un plan de monitoreo que sea concluyente para DG SANTE la Dirección General de Sanidad y Consumo de la Unión Europea y lograr el reingreso de los moluscos bivalvos a la Unión Europea (ADEX, 2014).

Finalmente, los resultados encontrados en este trabajo hacen de necesidad continuar monitoreando ambas bahías y considerarse un estudio de análisis de riesgos en las zonas de extracción.

CONCLUSIONES

- El estudio reporta tres (03) muestras positivas al virus de la Hepatitis A y nueve (09) muestras positivas a Norovirus GII por medio de la prueba de RT-PCR en tiempo real.
- El estudio no reporta muestras positivas a Norovirus GI por medio de la prueba de RT-PCR en tiempo real.
- La presencia del virus de la Hepatitis A y Norovirus GII en la Bahía de Mórrope indica un riesgo para la salud pública e inocuidad de los productos hidrobiológicos cultivados en esa zona, al igual que la bahía de Sechura donde se detectó Norovirus GII.

BIBLIOGRAFÍA

Ando, T., Monroe, S., Gentsh, J., Jin, Q., Lewis, D. & Glass, R. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round – structured viruses (Norwalk – like viruses) by reverse transcription – PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* (33): 64 – 71.

ADEX Asociación de Exportadores (2014), Restricciones sanitarias congelan envíos de “palabritas” a la Unión Europea, AdexNews, Acceso 13 de julio 2017, Disponible en: <http://www.adexperu.org.pe/BoletinesD/Prensa/BPrensa.asp?bol=2101&cod=5>

Cavero Cerrato, P., & Rodríguez Pinto, P. 2008. Producción sostenida de moluscos bivalvos en el Perú: acuicultura y repoblamiento. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*.

Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. Development, evaluation, and standardization of a realtime TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72 pp. 3846–3855

Decreto Supremo N° 07-2004-PRODUCE. Norma Sanitaria de Moluscos Bivalvos Vivos. Publicado Diario El Peruano.10 de marzo del 2004.

Da Silva A, Le Saux J, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, y Le Guyader F. 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of Genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol* 7891–7897.

Grenn, K., Lew, J., Jiang, X., Kapikian, A. & Estes, M. 1993. A comparison of the reactivities of the baculovirus – expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with the native Norwalk virus in serologic assays and some epidemiologic observations. *Jour Clin Microbio*; 2185 – 2191.

Guambo, J., 2009. Detección y genotipificación de norovirus GI/GII mediante Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), en muestras de heces de niños menores de 5 años que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda en el canton Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B. et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41 pp. 1548–1557

Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommepuy M., Le Guyader F.S. 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*. 123 pp. 1–7

Marcos, A., Gómez-Sánchez, M., & Hung, A. 2014. Detección del virus de la Hepatitis A en dos muestras de agua del Río Sechura, usando transcriptasa-reversa PCR en tiempo real. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 2(1), 1-6.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2016. Hepatitis A. Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva N° 328

Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-546.

Ribao, C., Torrado, I., Vilariño, M. L., & Romalde, J. L. 2004. Assessment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. *Journal of virological methods*, 115(2), 177-182.

Ritchie, A. 2015. Detección de Norovirus GI y GII en muestras de Agua del Río Sechura mediante la Técnica de RT- PCR en tiempo Real. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Romalde, J. L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., & Bosch, A. 2002. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 119-130.

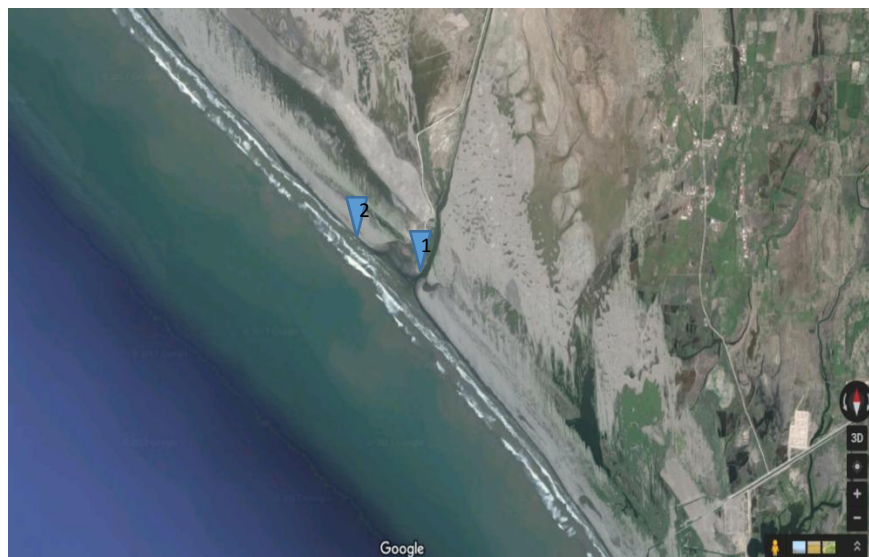
Romalde, J. L., Estes, M. K., Szücs, G., Atmar, R. L., Woodley, C. M., & Metcalf, T. G. 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 1921-1926.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., & Uyttendaele, M. 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *International journal of food microbiology*, 153 (1), 1-9.

Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E., van der Veer B., Dorresteijn B. et al. 2007.
Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from
1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*, **45** pp. 1389–1394

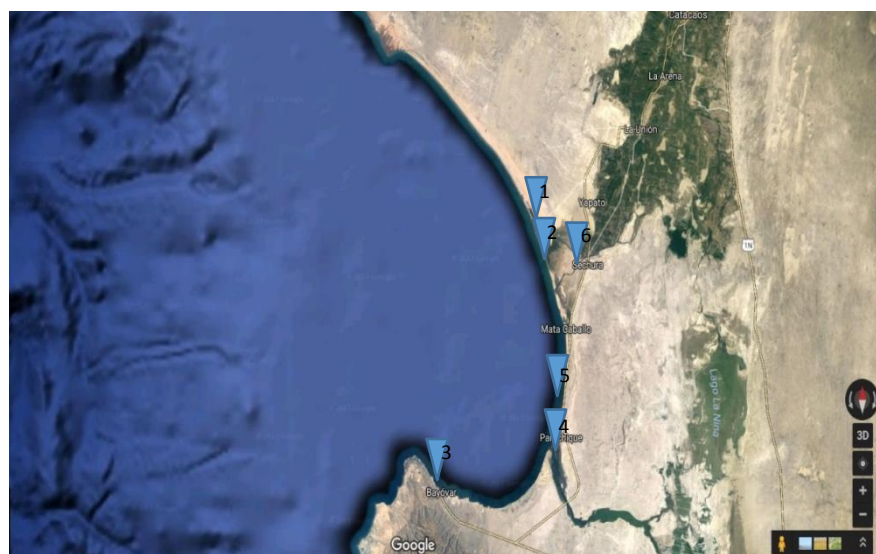
UE 2088. Decisión 2008/866/CEE.

ANEXOS



Fuente: google earth

Anexo 1.- Bahía de Mórrope: 1. Dren Mórrope (06°44'18.2" S, 079°59'55.2" W); 2. Mórrope 05 (06°43'52.9" S 080°00'28.9" W)



Fuente: google earth

Anexo 2.- Bahía de Sechura: 1. Estación San Pedro (05°31'06.1" S, 80°53'45.0" W); 2. Estación Chulliyachi (05°35'31.6" S, 80°52'00.5" W); 3. Estación Puerto Rico (05°49'15.2" S, 81°02'08.4" W); 4. Estación Parachique (05°46'20.1" S, 80°52'02.3" W); 5. Estación Las Delicias (05°43'26.5" S, 80°51'23.8" W); 6. Estación Dren Sechura (05°33'16.4" S, 80°49'36.3" W)