

Detección y cuantificación de virus de hepatitis A en moluscos en las bahías de Concepción y Arauco, Chile

Detection and quantification of hepatitis A virus in shellfish from Concepción and Arauco Bays. Chile

✉ Gonzalo Sanhueza¹, Viviana Cachicas¹

✉ ¹ Sección Microbiología de Alimentos. Departamento de Salud Ambiental. Instituto de Salud Pública de Chile.

✉ Autor para la correspondencia "Viviana Cachicas, e- mail: vcachica@ispch.cl

RESUMEN

Antecedentes: El virus de la Hepatitis A (VHA) se asocia comúnmente al consumo y manipulación de alimentos contaminados, entre otras causas, destacándose los moluscos bivalvos como una de las categorías de alimentos frecuentemente relacionadas a grandes brotes. La prevalencia y epidemiología de la enfermedad varía entre y al interior de cada país. En Chile, la región del Bío-Bío es actualmente de alta endemicidad de VHA, especialmente en comunas del borde costero, asociándose a insuficiencias en el saneamiento ambiental. **Objetivo:** Detectar y cuantificar las partículas virales de VHA en moluscos en las bahías de Concepción y Arauco, región del Bío-Bío, Chile, para el año 2016. Como una forma de evaluar la capacidad bioacumuladora de los moluscos bivalvos consumidos localmente y por ende el riesgo de enfermedad **Metodología:** Se analizaron 72 muestras, de la zona, correspondientes cada una, a un pool de hepatopáncreas proveniente de 10 especímenes. La detección se realizó vía retro PCR en tiempo real (RT-qPCR), y la cuantificación mediante la utilización de curva estándar realizadas para cada virus, interpolando los resultados de C_q observados, solo en el caso de las muestra VHA positivas. **Resultados:** El virus fue detectado en 35 de 72 muestras de moluscos principalmente almejas y mejillones de las dos bahías. La concentración de moluscos encontradas fue entre 10 y 3.900 copias del genoma por gramo de hepatopáncreas. **Discusión:** Desde al año 2000 al 2013, la región presentaba tasas de baja endemicidad similares al resto del país, periodo en que el país logró mejorar significativamente sus condiciones sanitarias. Los resultados sugieren la necesidad de reevaluar y fortalecer el saneamiento ambiental. Es necesario promover políticas que resguarden la producción formal de alimentos libres de patógenos, pero que también consideren la extracción informal. Así como es necesario generar sistemas de vigilancia de VHA conjuntos, clínicos, epidemiológicos y ambientales.



Palabras Claves:

Hepatitis A; VHA; Moluscos; Microbiología de alimentos; ARN viral; Latinoamérica

Keywords:

Hepatitis A; HAV; Mollusks; Food microbiology; Viral RNA; Latin America



Copyright © 2020. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la *Creative Commons Attribution License (CC BY)*. El uso, distribución o reproducción en otros foros esta permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

Conflicto de interés. Conflicto de interés. Los autores declaran no tener conflicto de interés

Financiamiento. Los autores declaran ser funcionarios del Instituto de Salud Pública, no habiendo obtenido remuneración ni compensación económica alguna por la elaboración de este artículo.

ABSTRACT

Background: Hepatitis A virus (HAV) is commonly associated with the consumption and handling of contaminated food, among other causes, with bivalve mollusks being highlighted as one of the food categories frequently related to large outbreaks. The prevalence and epidemiology of the disease varies between and within each country. In Chile, the Biobío region is currently high-endemic of HAV, especially in coastal edge communes, associated with environmental sanitation inadequacies. **Objective:** To detect and quantify HAV viral particles in mollusks in Concepción and Arauco bays, Biobío region, Chile, by 2016. As a way to evaluate the bioaccumulative capacity of locally consumed bivalve mollusks and hence the risk of disease **Methodology:** 72 samples from the area were analyzed for a pool of hepatopancreas from 10 specimens. Detection was performed via real-time retro PCR (RT-qPCR), and quantification by using standard curves performed for each virus, interpolating the observed Cq results, only in the case of positive VL Samples. **Results:** The virus was detected in 35 out of 72 samples of mollusks mainly clams and mussels from the two bays. The concentration of mollusks found was between 10 and 3,900 copies of the genome per gram of hepatopancreas. **Discussion:** From 2000 to 2013, the region had low endemic rates similar to the rest of the country, during which time the country managed to significantly improve its health conditions. The results suggest the need to re-evaluate and strengthen environmental sanitation. Policies need to be promoted that safeguard the formal production of pathogen-free food, but also consider informal extraction. As well as it is necessary to generate joint, clinical, epidemiological and environmental HAV surveillance systems.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis A (VHA) es un patógeno humano de origen viral, cuyos brotes se asocian frecuentemente al consumo de alimentos contaminados con heces humanas como moluscos, aguas insuficientemente desinfectadas, superficie de frutas y vegetales y contaminación cruzada producto de la manipulación de alimentos infectados (1,2) Este se extiende por todo el mundo, pero con amplias diferencias en la prevalencia y epidemiología de la enfermedad (3)

Particularmente en la transmisión por alimentos, Bosch y cols. en 2016 señalan que los moluscos bivalvos vivos son la categoría asociada con mayor frecuencia a brotes de VHA transmitidos alimentos (4). A saber, el brote de 1988 en Shanghái, China (El más grande de la historia), se atribuyó principalmente al consumo de alimentos en esta categoría, específicamente almejas (4). En Italia, pese a que en los últimos años la incidencia de la VHA se ha reducido aún se informan brotes de cientos de casos asociados al consumo de mariscos (5). Asimismo, en España los grandes brotes de 1999 y 2008, se asociaron al consumo de almejas (*Donax* sp.) importadas desde Perú (6) En 1988 en Florida EE.UU. se registraron 61 casos de hepatitis A donde el virus fue aislado de ostras (7). Por otro lado, en América latina son relativamente escasos los registros de brotes de hepatitis A por alimentos (7). Y en 2019 se prohibió la extracción de moluscos en el Callao, Perú, ante presencia de VHA (8).

El VHA, perteneciente al género Hepatovirus de la familia de Picornaviridae, es un virus ARN de hebra simple en sentido positivo de $\approx 7,5$ -kb con una cápside icosaédrica compuesta por tres proteínas estructurales (5,9,10). Su transmisión es principalmente persona-persona y vía oral-fecal (5) En la ruta fecal-oral el infectado puede liberar altas concentraciones

del virus (107 copias/mL en heces y 2.57×10^3 copias/mL en aguas servidas) poniendo en riesgo a la población una inadecuado tratamiento de aguas servidas (11).

En particular, los moluscos bivalvos acumulan microorganismos eventualmente presentes en sus aguas durante el proceso de alimentación, pudiendo concentrar varios patógenos humanos transmitidos a través de la ruta fecal-oral, entre ellos VHA el cual puede encontrarse en concentraciones hasta 100 veces mayores que en aguas circundantes y permanecer hasta por 7 días (5,12). Específicamente, las áreas utilizadas para la producción y recolección de moluscos bivalvos están situadas en entornos costeros o intermareales, los cuales pueden estar expuestos a la contaminación fecal humana mediante aguas de descarga, escorrentía después de eventos meteorológicos extremos, o desbordamientos de aguas residuales desde las plantas de tratamiento o alcantarillado (5).

En Chile la hepatitis A es una enfermedad endémica de notificación obligatoria (12), la prevalencia del VHA transmitido por alimentos ha disminuido desde 1970, con ciclos epidémicos de 3 a 5 años, debido principalmente a las mejoras sanitarias del suministro de agua potable y tratamiento de aguas servidas. Igualmente, a lo largo del tiempo han cambiado los perfiles etarios, desplazándose paulatinamente la presentación de la enfermedad desde edades tempranas hacia la adolescencia y adultez (13,14). Actualmente, la situación epidemiológica del país muestra una endemia intermedia, no uniformemente distribuida a lo largo de las distintas regiones y comunas del País (14). En consecuencia, mientras en las diversas regiones del Chile la incidencia de VHA ha disminuido, en la región del Biobío ha ido en aumento desde el año 2013, siendo actualmente de alta endemia de VHA, con tasas comunales de 100 casos x 100 mil habitantes sobretodo en comunas del borde costero,

asociado a insuficiencias en el saneamiento ambiental producto de fallas multisistémicas como tratamiento de aguas residuales, afloramiento de aguas servidas y presencia de emisarios submarinos como fuente de contaminación fecal (14,15)

En función de lo anterior, el objetivo del presente estudio es detectar y cuantificar las partículas virales de VHA en moluscos en las bahías de Concepción y Arauco, región del Biobío, Chile, para el año 2016. Todo con el fin de analizar el rol de los moluscos como bioacumuladores e indicadores de contaminación antropogénica ambiental, además del riesgo de su presencia en moluscos crudos o insuficientemente cocidos consumidos localmente en el País.

MATERIALES Y MÉTODOS

En base a muestras de moluscos obtenidos en las bahías de Concepción y Arauco en 2016, se extrajeron partículas virales y ácidos nucleicos con los cuales se determinó el número y proporción de moluscos infectados del total analizado. Adicionalmente, se describieron las muestras

positivas según semana epidemiológica, fecha, especie de molusco, comuna, genotipo, porcentaje de identidad y concentración.

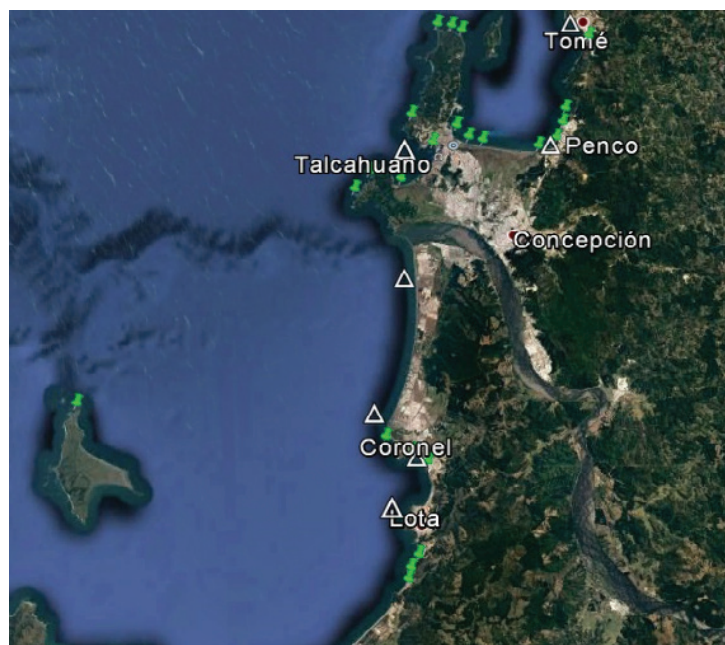
Muestreo de moluscos

Las muestras fueron obtenidas en las bahías de Concepción y Arauco, entre las latitudes sur -36° y -37° en las semanas epidemiológicas de 20 a 29 correspondiente a los meses de invierno, Abril a Julio, del año 2016 considerando la cercanía 11 emisarios submarinos de las dos bahías (figura 1).

Los moluscos, fueron adquiridos el día de la cosecha en el expendio artesanal de las localidades de Tomé ($n=27$), Penco ($n=2$), Lirquén ($n=4$), Talcahuano ($n=2$), Coronel ($n=12$), Lota ($n=19$) y Arauco ($n=6$). De los moluscos extraídos, se analizaron 72 muestras. Cada muestra corresponde a un pool de hepatopáncreas proveniente de 10 especímenes. Las especies fueron principalmente: almejas de la especie *Mercenaria mercenaria* (24 muestras), mejillones *Aulacomya ater* y *Choromytilus chorus* (37 muestras) y navajuelas (*Tagelus dombeii*) (11 muestras).

Figura 1

Georreferenciación de los 11 emisarios submarinos y áreas de extracción de muestras de moluscos, en las bahías de Concepción y Arauco, Región del Biobío, Chile 2016.



Triángulo blanco: emisarios submarinos de las bahías de Concepción y Arauco
Punto verde: Puntos de muestreos de moluscos.

Extracción de partículas virales

Los moluscos fueron parcialmente procesados hasta la obtención de hepatopáncreas en el Laboratorio Ambiental de la SEREMI de Salud Región del Biobío y trasladados en cadena de frío a los laboratorios de Santiago. Cada extracto de hepatopáncreas, fue inoculado con $1,46 \times 10^7$ partículas virales de virus Mengo® Ceeram/BioMerieux, previo a la extracción viral como control de proceso.

El extracto viral fue resuspendido en diez veces su volumen en agua destilada y homogenizada en licuadora, acorde recomendaciones US.FDA (16). El pH se ajustó entre 7,5 y 7,8 con HCl 6N y se centrifugó a 5.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 40 mL de Glicina 0,75M/ 0,15M NaCl, se llevó a pH 7,5 – 7,8 con NaOH 5N y centrifugó a 5.000 xg durante 15 min a 4°C. Posteriormente, el pellet se lavó nuevamente para recuperar el sobrenadante con 30 mL de una solución de Treonina 0,5M/NaCl 0,15M y centrifugó nuevamente a 5.000 xg por 15 min 4°C.

Ambos sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 170.000 xg durante 1h a 4°C. El pellet se resuspendió en 5 mL de PBS pH 7,5 y lavó con igual volumen de cloroformo y centrifugó a 1.700 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue nuevamente ultracentrifugado a 170.000 xg durante 1h a 4°C y el pellet obtenido, correspondiente al extracto viral, fue resuspendido en 1 mL de PBS pH 7,5 y almacenado a -80°C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos

El extracto viral fue lisado con una solución de isotiocianato de guanidina al 50%, Tritón al 2% y EDTA al 1%. La extracción de ARN se realizó utilizando partículas de sílica magnética, según la metodología descrita por Boom y cols. (17), utilizando sistema automatizado para la extracción de ácidos nucleicos EasyMAG-BioMerieux en un volumen de elución de 25 µL almacenado a 80°C hasta la detección molecular.

Detección de VHA y virus Mengo por Retro PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Las sondas y partidores utilizados fueron seleccionados en base a las secuencias recomendadas en la norma ISO 15216-1 2017 (18) (tabla 1). Para VHA se utilizaron secuencias que reconocen la proteína de la cápside VP1. Las secuencias fueron confeccionadas a pedido por IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc*), con fluoróforo FAM, y en concentraciones finales de 500-900 nM y 250 nM para partidores y sondas, respectivamente. Se realizó una amplificación de 5 µL de extracto utilizando el kit comercial LC 480 RNA Master Mix Roche® con los ciclos de amplificación recomendados por el fabricante del kit en termociclador Biorad XF 960 (retrotranscripción de 3 min a 63°C, hot start 30 seg a 95°C y amplificación de 40 ciclos consistentes en las etapas de denaturación a 95°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg, una extensión a 72°C por 10 seg y una extensión final a 40°C por 10 seg). Las muestras se consideraron positivas cuando la fluorescencia presentó valores superiores a la fluorescencia basal y presentó una curva sigmoidal. A partir de este valor de fluorescencia, denominado Cq, se confeccionó la curva estándar considerando la variable independiente de concentración en copias del genoma por reacción de retro PCR en tiempo real.

Cuantificación viral

La cuantificación del número de copias de RNA de VHA y virus Mengo presentes en las muestras positivas se estimó mediante la utilización de curva estándar realizadas para cada virus, interpolando los resultados de Cq observados.

Para VHA, se utilizaron diluciones seriadas en base 10 de ADN de doble hebra entregado por el CEFAS (*Centre for Environment Fisheries & Aquaculture Science*) (figura 2). Para virus Mengo® se utilizó una suspensión comercial de $1,46 \times 10^7$ cg/µL, Ceeram-Biomeriux® realizando la curva estándar previa inactivación por calentamiento del virus a 95°C por 5 min (figura 3).

Tabla 1

Secuencias de partidores y sondas recomendadas en ISO 15216-1-2017 y confeccionadas a pedido a IDTDNA™, para el virus de Hepatitis A y Mengo virus.

VHA	Secuencia
VHA (FW)	TCA CCG CCG TTT GCC TAG
VHA (REV)	GGA GAG GCC CTG GAA GAAAG
VHA (PROBE)	FAM-CCT GAA CCT ZEN GCA GGA AAT TAA A
Mengo Virus	Secuencia
Mengo 110 (FW)	GCG GGT CCT GCC GAA AGT
Mengo 2019 (REV)	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC
Mengo 147 (PROBE)	ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC

Figura 2

Curva de calibración de virus VHA.

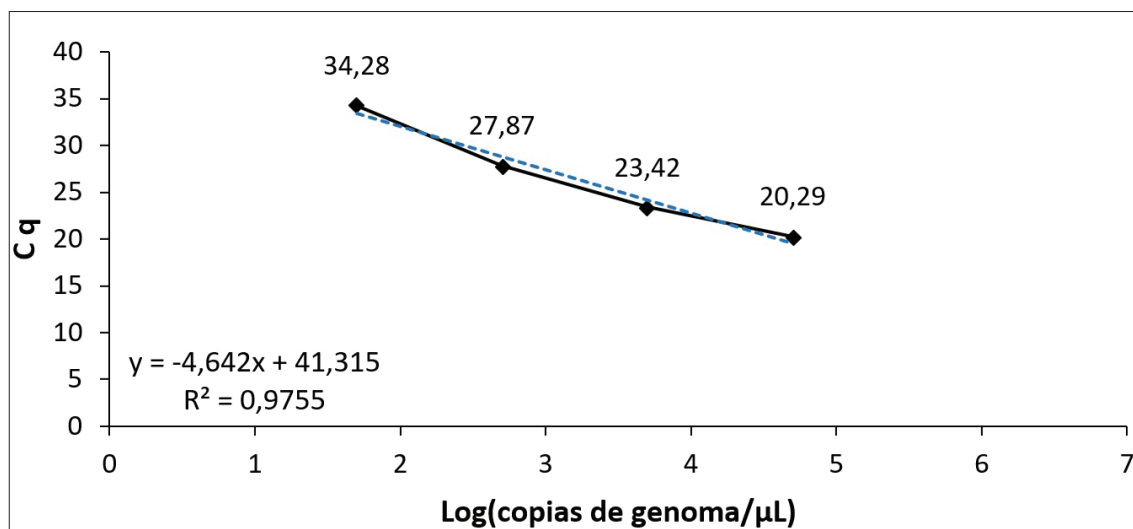
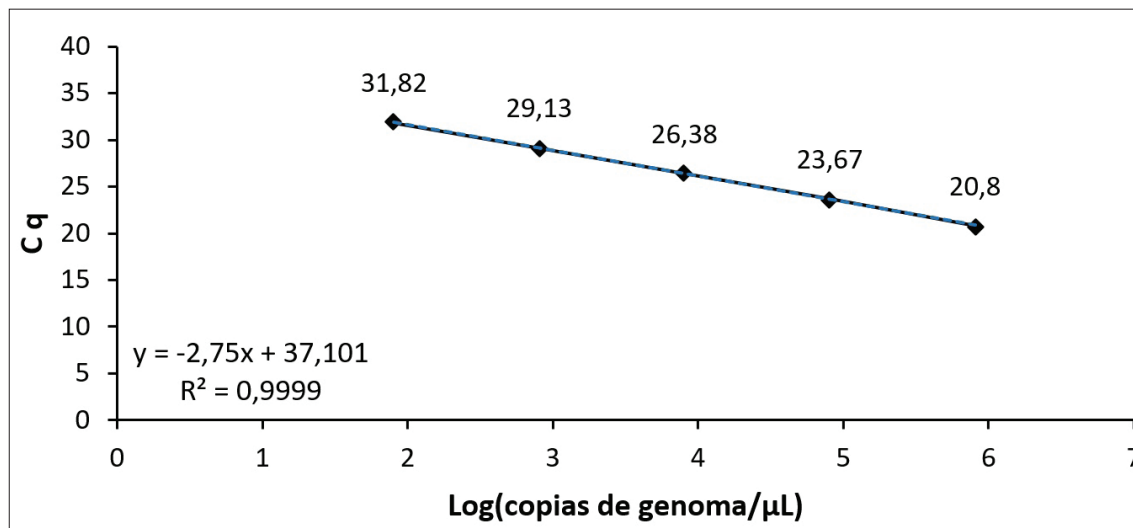


Figura 3

Curva de calibración de virus Mengo.



Los resultados fueron cuantitativos cuando el porcentaje del virus Mengo utilizado como control de proceso fue superior al 1%, según recomendaciones ISO 15216-1. Las muestras positivas fueron enviadas a confirmación molecular y secuenciadas en el fragmento del gen que codifica para la proteína de la cápside VP1/2A de

VHA mediante protocolos oficiales del Subdepartamento Genética Molecular del ISPCH.

Adicionalmente se estimaron los intervalos de confianza para la proporción de muestras positivas, totales, según comuna y según espécimen, considerando un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Detección

El VHA fue detectado en 35 de las 72 muestras de moluscos, es decir en un 48,6% (IC95%: 37,1% -60,2%) del total de muestras. Las muestras fueron positivas para VHA en 4 de las 7 comunas analizadas, 6 muestras en Coronel, 13 en Lota, 14 en Tomé y 2 en Talcahuano. En esta última, las dos muestras tomadas resultaron positivas, en el resto de la comunas mencionadas el porcentaje de positivos varió entre un 50% (Coronel, IC95%: 21,7% – 78,3%) y un 68,5% (Lota, IC95%: 47,5% – 89,3%). (Tabla 2)

Por espécimen, se detectaron muestras positivas en cholga (n=18), almeja (n=15) y choro zapato (n=2), con porcentajes de muestras positivas por espécimen de 52,9% (IC95%: 36,2% – 69,7%), 62,5% (IC95%: 43,1% – 81,9%) y 66,7%, respectivamente. (Tabla 2)

Cuantificación

Cuatro muestras no fueron cuantificadas por presentar porcentaje de recuperación del virus Mengo menores al 1%. Estas muestras pertenecían a los especímenes cholga (*Aulacomya ater*) y almeja (*Mercenaria mercenaria*) en las comunas de Tomé y Lota (Tabla 2).

La cuantificación se realizó utilizando la curva estándar para VHA intrapolando los Cq de las muestras y calculando

las copias de genoma por gramo de hepatopáncreas (Figura 2). El rango de concentración observado fue de entre 10 y 3900 copias de genoma por gramo en Log_{10} (gc /g) la concentración logarítmica varió entre 1 y 3,6, y la comparación de secuencias nucleotídicas en porcentajes de identidad fue entre un 97% y el 100%. El mayor número de muestras con la mayor concentración viral fue observado en la comuna de Coronel, en el espécimen cholga (*Aulacomya ater*). (Tabla 3)

Por comuna, en Coronel de 6 muestras positivas 1 presentó concentraciones por sobre los 3 logaritmos, en Lota 3 de un total de 13 muestras (con 4 muestras sin concentración determinada) y en Tomé 3 de 14, en esta última se pudo determinar la concentración en todas las muestras, a diferencia de Talcahuano en donde no se pudo determinar ninguna. Mientras que por espécimen, en *Aulacomya ater* 5 de 18 muestras (27,8%) presentaron concentraciones sobre 3 y en *Mercenaria mercenaria* 2 de 15 (13,3%). En *Choromytilus chorus* en una de las muestras la concentración no pudo ser determinada y en la otra fue de 1. (Tabla 3)

Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia de secuencias del VHA en 25 de los 35 muestras positivas por retro PCR en tiempo real.

En todos los casos en que se pudo determinar el genotipo (n=25) este fue del IA, comparadas con aislados clínicos obtenidos de la Región en el mismo periodo, la identidad observada fue entre 97% y 100% y en relación a cepa de referencia VHA X75216 de un 98% (Tabla 3).

Tabla 2

Resultados de muestras analizadas por comuna y especie de moluscos.

	Nro. de muestras	Nro. VHA +	% VHA	VHA VM <1%
Total	72	35	48,6%	4
Comuna				
Tomé	27	14	51,8%	2
Penco	2	0	0%	0
Lirquén	4	0	0%	0
Talcahuano	2	2	100%	0
Coronel	12	6	50,0%	0
Lota	19	13	68,4%	2
Arauco	6	0	0%	0
Especímen				
Cholga (<i>Aulacomya ater</i>)	34	18	52,9%	2
Navajuela (<i>Tagelus donbeli</i>)	11	0	0%	0
Almeja (<i>Mercenaria mercenaria</i>)	24	15	62,5%	2
Choro zapato (<i>Choromytilus chorus</i>)	3	2	66,7%	0

Todas las muestras fueron inoculadas con virus Mengo.

VHA VM < 1%: Muestras inoculadas con virus Mengo con recuperación menor a 1%

Tabla 3

Descripción de las muestras de moluscos con presencia de VHA (qRT-PCR positivo).

SE	Fecha (mes)	Especie de molusco	Comuna	Genotipo (VP1/2A)	% Identidad	Concentración Lg ₁₀ (gc /g)
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Lota	IA ***	99	Nd
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Lota	Nd	-	Nd
20	Mayo	<i>A ater</i>	Tomé	IA ***	97-100	1,7
20	Mayo	<i>A ater</i>	Lota	Nd	-	1
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Coronel	Nd	-	2,2
20	Mayo	<i>A ater</i>	Tomé	IA***	97-100	2,8
20	Mayo	<i>A ater</i>	Tomé	Nd	-	3,4
20	Mayo	<i>A ater</i>	Tomé	IA***	97-100	1,3
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Tomé	Nd	-	2,4
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Tomé	IA***	97-100	1,1
20	Mayo	<i>M mercenaria</i>	Lota	IA***	97-100	1,1
20	Mayo	<i>A ater</i>	Coronel	IA*	99,7	1,6
23	Junio	<i>A ater</i>	Talcahuano	IA*	99,7	Nd
23	Junio	<i>M mercenaria</i>	Talcahuano	Nd	-	Nd
23	Junio	<i>Ch chorus</i>	Lota	IA*	100	Nd
23	Junio	<i>A ater</i>	Lota	IA*	99,7	Nd
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Lota	Nd	-	3
24	Junio	<i>A ater</i>	Lota	IA*	99,7	2,1
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Lota	IA*	99,7	3
24	Junio	<i>A ater</i>	Coronel	Nd	-	3,6
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Tomé	IA*	99,7	2,5
24	Junio	<i>A ater</i>	Tomé	IA*	99,7	3,4
24	Junio	<i>A ater</i>	Tomé	IA*	100	2,1
24	Junio	<i>A ater</i>	Tomé	IA*	99,7	3,1
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Tomé	IA*	99,6	2,6
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Tomé	IA*	99,7	2,5
24	Junio	<i>A ater</i>	Lota	IA*	99,7	2,3
24	Junio	<i>A ater</i>	Lota	IA*	99,7	3,2
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Lota	IA*	100	2,8
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Lota	IA*	100	2,7
24	Junio	<i>M mercenaria</i>	Coronel	IA*	99,7	2,3
24	Junio	<i>A ater</i>	Tomé	IA*	99,7	2,8
24	Junio	<i>A ater</i>	Tomé	IA*	99,7	3,3
29	Julio	<i>Ch chorus</i>	Coronel	Nd	-	1
29	Julio	<i>A ater</i>	Coronel.	Nd	-	1,4

Nd: no determinado SE: Semana Epidemiológica

* Aislados ambientales 100 % homólogos

** Aislados ambientales 98% homólogos a cepa de referencia VHA X 75216,1

*** Aislados ambientales entre 97% -100%

% homólogos a muestra clínica del periodo de estudio y región

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran la presencia del virus de la hepatitis A en los moluscos en las dos Bahías de la Región del Biobío para casi la mitad de las muestras, en cuatro de las siete comunas analizadas y para diversas especies de moluscos bivalvos.

El hallazgo de moluscos con presencia de VHA plantea problemas sanitarios y de gestión, siendo necesaria una vigilancia sistemática de los brotes asociados a estos y una regulación de las áreas de producción y comercialización de mariscos bivalvos vivos, así como la determinación de los indicadores más adecuados para realizar tal labor (5).

En el presente estudio, el 47% de las muestras de moluscos bioacumulaban concentraciones por gramo de hepatopáncreas similares a la dosis infectiva de ≈ 100 partículas virales. Dependiendo del tamaño del molusco se puede obtener la dosis infectiva de ingesta en el consumo de menos de una decena de moluscos crudos. Todo esto en cholga, almeja y choro zapato, todos utilizados comúnmente para consumo humano. Estos resultados se complementan con lo analizado por González-Sandia y cols en 2017 (19) a nivel de saneamiento ambiental, específicamente, describió una correlación positiva entre la contaminación fecal de la Bahía de Concepción y los casos de VHA descritos en la Región, en el cual se reveló el gran impacto antropogénico de las dos bahías que se ve reflejado en que ha existido solo un área reconocida por Sernapesca en su programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos para la extracción de moluscos con fines de exportación. Es el caso del presente estudio de Navajuelas en la comuna de Coronel.

La caracterización molecular de brotes de VHA asociados a los alimentos en Latinoamérica usados no está muy documentada probablemente por el diagnóstico indirecto por serología que se realiza en las muestras de sangre de los pacientes como metodología de confirmación y el prolongado tiempo que transcurre entre los síntomas y la ingesta del alimento contaminado de entre 15 y 50 días. Estos dos factores, revelan la gran dificultad que entraña describir la cadena de transmisión alimentaria (7).

La evidencia sugiere la necesidad de complementar las vigilancias clínicas con las ambientales. La presencia de VHA en los moluscos pone en riesgo la salud del consumidor ya que los moluscos bivalvos encontrados en ecosistemas acuáticos contaminados pueden convertirse en concentradores biológicos de patógenos humanos, pudiendo filtrar entre 0,5 y 4 litros de agua por hora, dependiendo de su tamaño y condiciones ambientales. En particular los virus entéricos se acumulan principalmente en el tracto digestivo de los moluscos bivalvos, por lo cual el peligro

de esta bioacumulación de microorganismos patógenos radica en que estas especies suelen consumirse crudas o ligeramente cocinadas e ingiriéndose el animal completo, incluidas las vísceras (20). Esto ya puede presentar un desafío en condiciones de regulación, pero se acentúa frente a la recolección ilegal. A modo de ejemplo en 1988 en Florida EE.UU. se registraron 61 casos de hepatitis A, donde el virus fue aislado de ostras, además se detectaron altos niveles de contaminación fecal en áreas donde estaba prohibida la recolección de ostras, sugiriendo la recolección ilegal de estas (7).

En Chile, existe poca información de brotes por VHA causados por la ingesta de moluscos. El año 2000 se observaron tasas bajas de 3-6 por 100 mil habitantes hasta el 2013 donde se inició el aumento de tasas llegando a valores superiores a 100 en las comunas principalmente costeras de la Región del Biobío. Lamentablemente entre los años 2017 y 2018 se notificó un gran brote de VHA en la Región Metropolitana sin relación a la ingesta de alimentos ni aguas insuficientemente tratadas, sino al descrito en Europa relacionado a brotes por transmisión sexual de sexo entre hombres (15).

En relación a los aislados de VHA de moluscos y cepa clínica de este estudio y su identidad cercana a la cepa de referencia del genotipo IA utilizada como control por el Subdepto de Genómica Molecular (X75216.1); estos aislados son filogenéticamente distantes a los aislados descritos al año siguiente de este estudio en Chile relacionados con brote de VHA de transmisión sexual probablemente asociados a cepas introducidas en el país (21) y más cercanos a los descritos por Costa-Mattioli M y cols en el año 2001 (22). Llama la atención que el estudio del 2001, el Genotipo IA se describió por primera vez en aislados clínicos en Chile, cuando el país Chile presentaba los inicios de una década de baja endemia y donde este genotipo fue también encontrado en forma simultánea en Argentina, Uruguay y Brasil con varios subgenotipos circulantes.

Los resultados de este estudio, y estudios de esta naturaleza en general, ayudan a la gestión en salud junto a los diversos enfoques como es la importancia de la inmunización, reforzamiento del tratamiento de las aguas servidas u otras fuentes de contaminación antropogénica.

Si bien la incidencia de infecciones por VHA ha disminuido mundialmente hasta un bajo nivel de transmisión en países desarrollados por el avance significativo de políticas de higiene ambiental, hay regiones de no endémicas en que el VHA ha reemergido en afectando especialmente adultos jóvenes (10) y generado brotes de mayor severidad. Y aunque no todos son atribuibles a consumo de moluscos esta sigue siendo una causa importante a considerar.

AGRADECIMIENTOS

Funcionarios del SEREMI de Salud de la Región del Biobío, especialmente a Carlos Sepúlveda y Juan Manuel Molina por su participación en el muestreo; Claudia Henríquez y Carmen Niedman por su apoyo en el uso de los Laboratorios. Julia Manríquez, Lino Alarcón y Ana Silva por el apoyo epidemiológico e Iván Ríos por su apoyo desde la unidad de Epidemiología del Ministerio de Salud. Han apoyado en la búsqueda de información y discusión de resultados Aldo Barrera del Laboratorio de Virología Molecular por su estudio de HAV de transmisión relacionado con transmisión sexual, Rodrigo Dougnac del programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos de Sernapesca y Jesús Romalde de la Universidad de Santiago de Compostela por su experiencia en la detección y cuantificación de virus entéricos en aguas y moluscos. Dentro del ISPCH, agradecemos a la Sección Microbiología de Alimentos, especialmente a Mónica Jara y M^a Cristina Martínez, y al Subdepartamento de Epidemiología molecular, especialmente a Bárbara Parra y Jorge Fernández.

Referencias Bibliográficas

1. Lowther JA, Bosch A, Butot S, Ollivier J, Mäde D, Rutjes SA, et al. Validation of EN ISO method 15216 - Part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2019 Jan;288:82–90. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160517305081>
2. Randazzo W, Sánchez G. Hepatitis A infections from food. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2020 May 29;jam.14727. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.14727>
3. AMSE. Hepatitis A. Epidemiología y situación mundial [Internet]. [cited 2020 Jun 15]. Disponible en: [https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/106-hepatitis-a-epidemiologia-y-situacion-mundial#:~:text=Se calcula que se producen,países de Europa del Este.](https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/106-hepatitis-a-epidemiologia-y-situacion-mundial#:~:text=Se%20calcula%20que%20se%20producen,pa%C3%ADses%20de%20Europa%20del%20Este.)
4. Quang Le H, Suffredini E, Tien Pham D, Kim To A, De Medici D. Development of a method for direct extraction of viral RNA from bivalve molluscs. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2018 Nov;67(5):426–34. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/lam.13065>
5. Suffredini E, Proroga YTR, Di Pasquale S, Di Maro O, Losardo M, Cozzi L, et al. Occurrence and Trend of Hepatitis A Virus in Bivalve Molluscs Production Areas Following a Contamination Event. *Food Environ Virol* [Internet]. 2017 Dec 27;9(4):423–33. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12560-017-9302-8>
6. Polo D, Vilariño ML, Manso CF, Romalde JL. Imported Mollusks and Dissemination of Human Enteric Viruses. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2010 Jun;16(6):1036–8. Disponible en: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/6/09-1748_article.htm
7. Ferrari CKB, Torres EAFS. Contaminación de los alimentos por virus: Un problema de salud pública poco comprendido. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Heal*. 1998;3(6):359–66.
8. Gestión. Prohíben extracción de moluscos en el Callao ante presencia del virus de la hepatitis. *Gestión* [Internet]. 2019; Disponible en: <https://gestion.pe/economia/prohíben-extracción-de-moluscos-en-el-callao-ante-presencia-del-virus-de-la-hepatitis-noticia/?ref=gesr>
9. WHO. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities [Internet]. Vol. 13. 2008. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>
10. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 Jan 1;90(1):23–41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672828>
11. Arankalle VA, Sarada Devi KL, Lole KS, Shenoy KT, Verma V, Haneephabi M. Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. *Indian J Med Res*. 2006 Jun;123(6):760–9.
12. ACHIPIA. Hepatitis víricas: Virus de la hepatitis A. Vol. 3, Ficha de Peligros, ACHIPIA. 2017.
13. MEDINA D. B, OLEA N. A, AGUILERA S. X. Situación epidemiológica de hepatitis A en Chile. *Rev Chil infectología* [Internet]. 2003;20(4). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So716-10182003000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
14. MINSAL. Boletín Epidemiológico Trimestral, Volumen 111, no 4, año 2015. HEPATITIS A Y HEPATITIS VIRAL SIN OTRA ESPECIFICACIÓN. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, ENERO-SEPTIEMBRE. 2015.
15. MINSAL. Boletín Epidemiológico trimestral Hepatitis A. S1-S2 AÑO 2019. 2019.
16. Williams-Woods J, Hartman G, Burkhardt III W. (FDA) BAM Chapter 26B: Detection of Hepatitis A Virus in Foods [Internet]. Laboratory Methods (Food). 2017 [cited 2020 May 2]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-26b-detection-hepatitis-virus-foods>
17. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1990 Mar;28(3):495–503. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691208>
18. ISO. ISO 15216-1, Microbiology of the food chain-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part 1: Method for quantification. 2017.
19. González-Saldía RR, Pino-Maureira NL, Muñoz C, Soto L, Durán E, Barra MJ, et al. Fecal pollution source tracking and thalassogenic diseases: The temporal-spatial concordance between maximum concentrations of human mitochondrial DNA in seawater and Hepatitis A outbreaks among a coastal population. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019; Disponible en: <https://www.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719324684>
20. Carmen FM. DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MOLUSCOS Y MUESTRAS CLÍNICAS. GENOTIPADO Y ESTUDIO POBLACIONAL [Internet]. Universidad de Santiago de Compostela; 2013. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/61964731.pdf>
21. Rivas V, Barrera A, Pino K, Núñez R, Caceres CJ, Lopez-Lastra M, et al. Hepatitis A outbreak since November 2016 affecting Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Eurosurveillance* [Internet]. 2018 Mar 1;23(9). Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.18-00060>
22. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol*. 2002 Sep;76(18):9516–25.