

## DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A (VHA) EN LECHUGA Y BRÓCOLI EN EL MUNICIPIO DE IRAPUATO, GUANAJUATO

C. Ramírez-Martínez<sup>a</sup>, M.F. León-Galván<sup>a,b</sup>, y M.C. Del Rincón-Castro<sup>a,b\*</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. <sup>b</sup> Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. \*cdelrincon@ugto.mx

### RESUMEN:

Las crucíferas se consideran las hortalizas de mayor importancia socioeconómica en la región de El Bajío. Las enfermedades transmitidas por virus entéricos en los alimentos y en hortalizas en lo particular, muy pocas veces se examinan para detectar la presencia de patógenos virales. En el presente trabajo se realizaron extracciones de RNA total de diferentes lotes de lechuga y brócoli de la zona centro del estado de Guanajuato con la finalidad de detectar el virus de la Hepatitis A (VHA) por medio de RT-PCR. De los 5 lotes de lechuga y 8 de brócoli que se analizaron con oligonucleótidos específicos para detectar el VHA, en ninguno de los lotes de lechuga se detectó a este virus, pero en uno de los lotes de brócoli, si se detectó la presencia de un amplicón de 250 pb, el cuál correspondió al tamaño de amplicón esperado para la proteína de la cápside del VHA. Es necesario realizar más estudios de RT-PCR en nuevo lotes de producción de ambas hortalizas, con el fin de determinar si es constante la posible presencia del VHA y el papel que las aguas de riego juegan en la contaminación con este tipo de patógenos.

### ABSTRACT:

Cruciferous vegetables are the most important in the region of El Bajío, for the area planted, the value of production and the jobs they generate. Diseases caused by enteric viruses in food in general and vegetables in particular, are a major problem, with very few cases where they are examined for the presence of viral pathogens. In this paper were performed the extraction of total RNA from different batches of lettuce and broccoli in the downtown area of the state of Guanajuato in order to detect Hepatitis virus (HAV) by RT-PCR. 5 lots of lettuce and 8 of broccoli were analyzed with specific oligonucleotides to detect HAV. In none of the lots of lettuce was detected this virus, but one of the lots of broccoli, if detected the presence of an amplicon from 250bp, which corresponded to the size expected for the capsid protein of HAV. Further studies are needed to analyze new production batches of both vegetables, in order to determine whether it is constant the possible presence of the HAV or other enteric viruses and determine what the role of water with which these vegetables are irrigated as a possible cause of pollution of these.

**Palabras clave:** VHA, RT-PCR, Hortalizas

**Keywords:** VHA, RT-PCR, Hortalizas

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las crucíferas se consideran las hortalizas de mayor importancia socioeconómica en la región de El Bajío, por la superficie sembrada, el valor de su producción y por las fuentes de trabajo que generan. El producto que se cosecha se destina principalmente al mercado de exportación, lo que representa una significativa fuente de divisas. Según datos de la Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural en la producción de alimentos como brócoli, aporta el 60.16% del mercado nacional con

200,486.6 toneladas y en lechuga, el 23.08%, con una producción de 73,348.50 toneladas. En la actualidad existen diversas áreas de producción de estas hortalizas que se encuentran cerca de algunas fuentes de infección y al entrar en contacto con dichas fuentes pueden ocasionar graves enfermedades entre las cuales se encuentra la Hepatitis A causada por el virus de hepatitis A o VHA (Fernández *et al*, 2001). El consumo de alimentos contaminados es una importante ruta de transmisión de algunos virus, incluyendo al VHA (Bidawid *et al*, 2000). El VHA se detecta y diagnostica comúnmente por métodos bioquímicos e inmunológicos y prácticamente no existen en México estudios sobre la detección del VHA en alimentos por métodos moleculares. Las técnicas de biología molecular detectan secuencias genómicas de los diferentes virus entéricos, aún y que estos se encuentre en muy bajos niveles (Butot *et al*, 2007; Pujol, 2009). Más aún, se sabe que los alimentos crudos o cocinados inadecuadamente favorecen la transmisión de infecciones virales.

Por otro lado, en el estado de Guanajuato existen entidades donde los cultivos se riegan con diferentes calidades de agua entre las cuales destacan las aguas negras, agua tratada y agua blanca; lo que implica un foco rojo de infección de distintas enfermedades entre las cuales puede estar el virus de Hepatitis A. En las aguas residuales que se vierten al ambiente, se han detectado concentraciones de virus que van alrededor de 100,000 enterovirus por litro y se pueden verter alrededor de  $10^9$  partículas víricas al día (Bofill-Mas *et al.*, 2005). En México, aún no se ha analizado la contaminación de alimentos por virus, ni el papel que éstos juegan. Más allá del efecto económico, sin duda alguna el efecto más preocupante de regar a las hortalizas con aguas contaminadas, lo representarían los daños potenciales en la salud humana, principalmente para aquellas personas que consuman brócoli o lechugas contaminadas con algún virus entérico, de ahí que su detección oportuna y precisa, se vuelve un requisito fundamental. En el presente trabajo de investigación se analizaron mediante la extracción de RNA de diferentes lotes de lechuga y brócoli, seguidos de un RT-PCR, la presencia del virus VHA en ambas hortalizas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Áreas de colecta de brócoli y lechuga.**

Las zonas de estudio del presente trabajo fueron diversas áreas de cultivo de brócoli y lechuga de productores de la zona cercana a los municipios de Irapuato, Abasolo, Silao y Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato. Las muestras de este trabajo fueron proporcionadas por diversos productores de ambas hortalizas. Se colectaron lechugas de 5 lotes de producción diferentes y brócoli de 8 lotes de producción distintos.

### **Extracción de RNA por el método de Cloruro de Litio**

Se tomaron 0.5 g de brócoli o lechuga molidos y se agregaron 500 µl de buffer NTES (cloruro de sodio 1M, SDS 0.5%, 10mM de Tris HCl pH 8.0 y EDTA 1mM) y 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1). Se centrifugó a 13 000 rpm/10 min y se transfirió el sobrenadante a tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1). Se centrifugó a 11 000 rpm/15 min, se recolectó el sobrenadante y se añadió 50 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 500 µl de isopropanol frío (1/10 v/v), y se incubó a -20°C por 2 h y 30 min. Se centrifugó a

11 000 rpm/10 min, se desechó la fase acuosa y se dejó secar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 300 µl de agua DEPC, se centrifugó a 10 000 rpm/10 min para recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf nuevo y estéril. Para precipitar el RNA, se colocaban 180 µl de cloruro de litio 10 M. Se incubó la fase acuosa en el transcurso de la noche a -20°C para precipitar el RNA, y se centrifugó a 11 000 rpm/15 min, se desechó el sobrenadante.

### Síntesis de cDNA de doble cadena

2µL de muestra de RNA, 1µL de oligo 3'oligonucleótido IIA SMART CDS, 1µL de oligo 5' oligonucleótido SMART IIA, 1µL de agua destilada para tener un volumen total de 5µL. Se insertó en el termociclador a 72°C por 2 minutos, al término del ciclo se agregó 2µL de regulador de primera cadena 5x, 1µL de Ditiotreitól (DTT) 20Mm, 1µL dNTP's 50x, 1µL de transcriptasa reversa Super Script II. La mezcla de reacción se incubó a 42°C por una hora y al término de ésta se agregaron 40µL de agua destilada. Posteriormente se a 72°C por 7 minutos y se almacenó a -20°C. Estos tubos fueron etiquetados como "primera cadena de DNA". Para la segunda cadena se tomaron 5µL de cDNA de primera cadena, 0.3µL de Taq polimerasa, 3µL de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de dNTP's 50x, 5µL de regulador Taq Polimerasa, 1µL de oligonucleótido 5'PCR IIA (10µM), 34.7µL de agua destilada. Se desnaturalizó a 94°C por 1 minuto, por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 45 segundos, 72°C por 7 minutos (y una extensión final de 10 minutos a 72°C).

### Diseño de oligonucleótidos

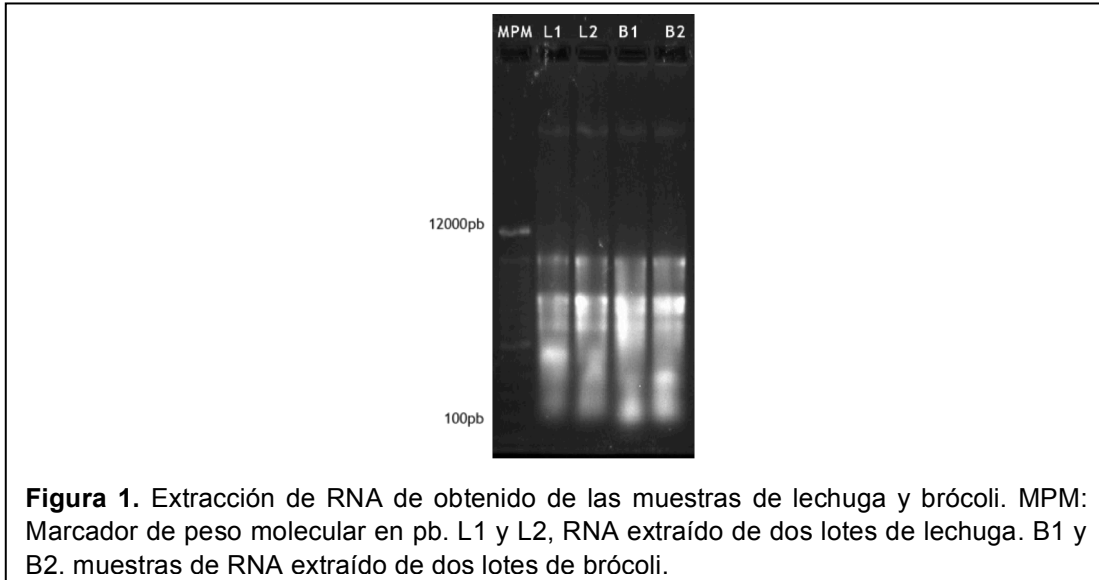
Los iniciadores específicos para la detección del VHA se seleccionaron a partir del alineamiento de las regiones no codificantes del extremo 5' del genoma de varias cepas del VHA previamente secuenciadas. Los iniciadores externos VHA1 y VHA2 flanquean la región comprendida entre los nucleótidos 332 y 700 de la cepa HM-175 (Cohen, *et al.*, 1987) dentro de la región no codificante del extremo 5' y su utilización como amplificadores generarán un fragmento que fluctuará entre las 250 y 368 pb (Tabla I).

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el VHA			
Posición	Nombre	Tamaño	Secuencia
332-352	VHA1	250-350 pb	5'TTGGAACGTACCTTGCAAGTG-3'
680-700	VHA2		5'CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC-3'

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al probar el método de extracción de cloruro de litio para obtener RNA de las muestras de lechuga y brócoli de los diferentes lotes de producción, los resultados fueron reproducibles y se logró la extracción de un RNA de excelente calidad. De un total de 25 repeticiones obtenidas para los 5 lotes de lechuga y para los 8 lotes de brócoli, se logró extraer RNA de excelente calidad en 20 de ellas, lo cual nos arrojó resultados positivos que correspondían a una eficiencia de extracción del 80%. Esta fue una evidencia contundente de que el método de Cloruro de Litio, fue muy efectivo para la extracción del RNA de ambas hortalizas. Como se puede observar en la Figura 1, en todas las muestras de lechuga procesadas cuya extracción de RNA fue exitosa (carriles L1 y L2), se obtuvieron dos bandas de RNA de distinto peso

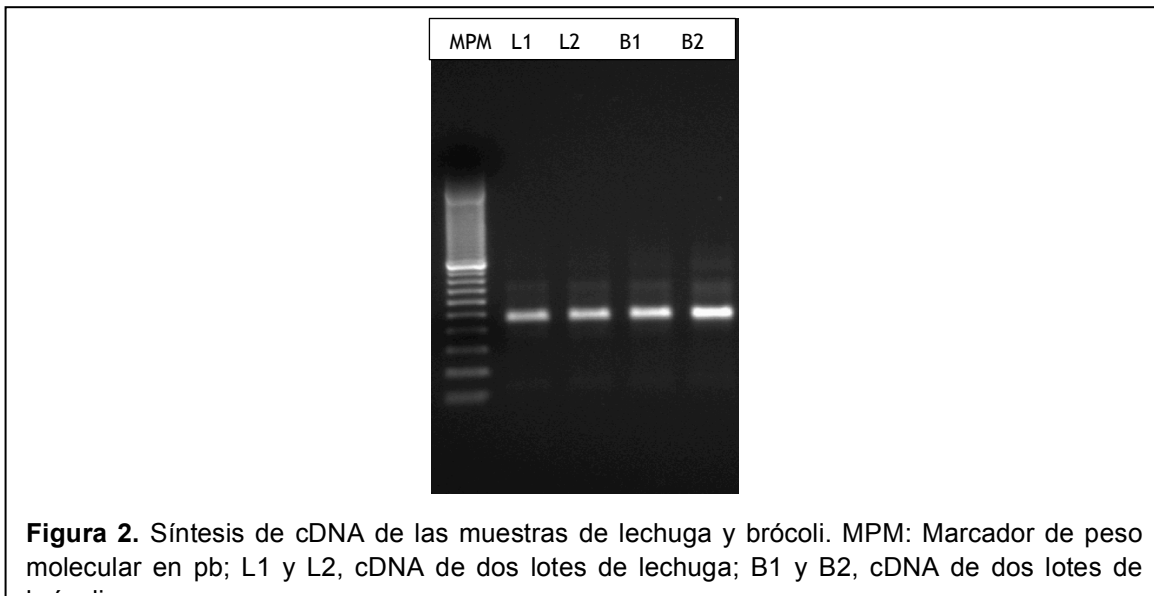
molecular de forma reproducible, ambas bandas correspondían a los RNA mensajeros y ribosomales (bandas de 2000 pb y 1000 pb respectivamente). Asimismo, en todas las extracciones positivas de RNA de brócoli, se logró extraer RNA de la misma calidad y pureza que en el de la lechuga (Figura 1, carriles B1 y B2).



B2).

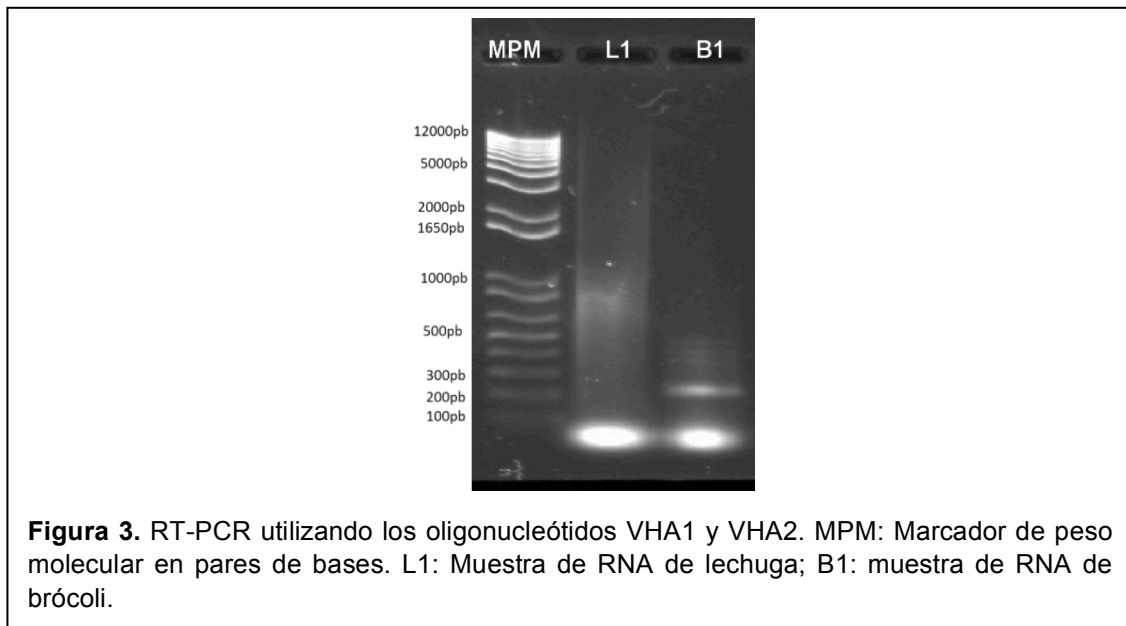
### Síntesis de cDNA de doble cadena y amplificación por RT-PCR

Se realizó la síntesis de cDNA de doble cadena en 2 muestras de lechuga (L1 y L2) y en dos muestras de brócoli (B1 y B2) en las que previamente se había logrado extraer RNA de buena calidad, de los cuales en ambas muestras se obtuvo cDNA (Figura 2, carriles 2 al 5). Posteriormente a estas muestras se les realizó RT-PCR para lograr una amplificación de copias del gen de la proteína de la cápside del VHA.



### RT-PCR con oligonucleótidos del VHA.

Se realizó una amplificación por RT-PCR a las muestras donde se obtuvo cDNA, las cuales correspondieron a las muestras L1, L2, B1 y B2. El lote B1 amplificó una banda de 250 pb (Figura 3, carril B1), en las muestras L1 (Figura 3, carril L1), L2 y B2 (datos no presentados), no se obtuvo ningún amplicón. La muestra que amplificó por medio del RT-PCR se envió a secuenciación para poder comparar en la plataforma del NCBI de que origen es el amplicón y demostrar que efectivamente sea una secuencia del VHA.



Se debieron tomar algunas precauciones al momento de coleccionar las muestras de hortalizas, fue preciso no cosecharlas con las manos directamente, para no contaminar al producto cosechado. Según un trabajo de Bidawid y colaboradores (2000), un factor muy importante en la transmisión de VHA es la manipulación de alimentos en fresco por personas infectadas. Estos investigadores comprobaron que cuando los voluntarios del estudio se limpiaban las manos con alcohol, al manipular lechugas contaminadas intencionalmente con VHA, la transmisión del virus se reducía de un 9% a tan solo un 0.3%. Por otro lado, en el trabajo realizado por Quiroz (2008) ellos utilizaron la extracción de RNA de virus entéricos en alimentos, mediante el empleo de TRIzol® Reagent y no mediante el método de cloruro de litio empleado en este trabajo. Los resultados positivos obtenidos por estos autores se pudieron deber a que con el método de extracción empleado, detectaron la presencia de virus inoculados intencionalmente (Quiroz, 2008).

En el caso de nuestro trabajo, también probamos los métodos de extracción de RNA utilizando PEG y TRIzol® Reagent (datos no presentados), pero las extracciones de RNA después del análisis electroforético mostraron resultados negativos. Esto pudo deberse a que las muestras se dañaron o se perdió la cadena del frío en algún punto del transporte de dichas hortalizas y por consecuencia esto pudo ocasionar la degradación del RNA. No obstante, en este trabajo se obtuvo una excelente extracción de RNA utilizando el método de cloruro de litio. En comparación con el

trabajo de Quiroz (2008), para nuestra extracción no se utilizó ningún tejido de las hortalizas infectado deliberadamente con el VHA, motivo por el cuál la detección de este virus dependía exclusivamente de su presencia natural al momento de la cosecha.

Por otro lado, en las muestras de lechuga no fue posible detectar la presencia del VHA, mientras que en las muestras del brócoli si se detectó en una de las muestras analizadas. Esto nos corrobora que si es posible detectar mediante el RT-PCR la presencia posible del VHA en ésta hortaliza, manifestándose la utilidad de esta técnica previamente probada por otros autores (Jean *et al*, 2001). Por otro lado, considerando la diferencia en consistencia de tejidos entre lechugas y brócoli, es lógico pensar que las primeras sufran de un mayor daño mecánico en el transporte debido a la naturaleza blanda de sus tejidos, mientras que en las segundas, la resistencia de los tejidos del brócoli es claramente visible y ello hace su manipulación más fácil de trabajar y menos difícil de dañar. Es necesario esperar el resultado de la secuencia del amplicón de 250 pb obtenido en la muestra de brócoli para corroborar que efectivamente corresponda a una secuencia del VHA, debido a que el tamaño de la amplicón coincide con el tamaño esperado, es altamente factible que así sea. No obstante, es necesario continuar con las extracciones de RNA y análisis de RT-PCR en un mayor número de muestras de ambas hortalizas, para validar el método de detección del VHA como eficiente y reproducible.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bidawid, S., Farber, J.M. & Sattar, S.A. 2000. Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2759-2763.
- Bofill-Mas S., Clemente-Casares P., Albiñana-Giménez N., Maluquer de Motes P. C., Hundesa G. A. y Girones L. R. 2005. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista Española de Salud Pública*. 79 (2), 253-269.
- Butot, S., Putallaz, T. & Sánchez G. 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 186-192.
- Cohen J. I., Ticehurst J. R., Feinstone S. M., Rosenblum B., & Purcell R. H. 1987. Hepatitis A Virus cDNA and Its RNA Transcripts Are Infectious in Cell Culture. *Journal of Virology*, 61 (10), 3035-3039.
- Fernández Molina, M.C., Alvarez Alcántara, A., & Espigares García, M. 2001. Transmisión feco-hídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 1, 8-16.
- Jean J., Blais B., Darveau A. & Fliss I. 2001. Detection of Hepatitis A Virus by the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Technique and Comparison with Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5593-5600.
- Pujol Flor H. 2009. Evolución molecular de los virus de hepatitis en Latinoamérica. *Virología-Acta científica Venezolana*, 60(4), 202-207.
- Quiroz Santiago, C. 2008. Identificación de virus entéricos en hortalizas y ostiones. Tesis de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas-IPN-Escuela Nacional de Ciencias biológicas, 8-20.