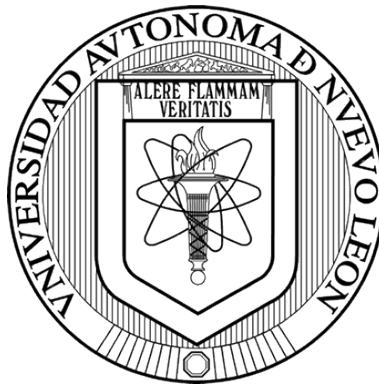


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DETECCIÓN DE VIRUS DE HEPATITIS A Y NOROVIRUS EN ALIMENTOS**  
**BASADA EN CRISPR SHERLOCK**

**POR**

**AXEL ALEJANDRO OSSIO RODRIGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN**  
**CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**2025**

**“DETECCIÓN DE VIRUS DE HEPATITIS A Y NOROVIRUS EN ALIMENTOS BASADA EN  
CRISPR SHERLOCK”**

**Comité de Tesis**



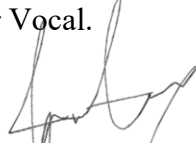
Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Directora/ Presidenta.



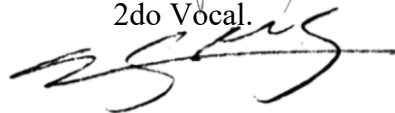
Dra. Yaraymi Ortiz Reyes  
Secretario



Dr. José Santos García Alvarado  
1er Vocal.



Dr. Jose Angel Merino Mascorro  
2do Vocal.



Dr. Eduardo Franco Frías  
3er Vocal.





SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arevalo Niño  
Subdirección de Posgrado

**“DETECCIÓN DE VIRUS DE HEPATITIS A Y NOROVIRUS EN ALIMENTOS BASADA EN  
CRISPR SHERLOCK”**

**Comité de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Norma/ Laura Heredia Rojas  
Directora/ Presidenta.

**DERECHOS RESERVADOS©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, así como a la dirección de Posgrado de esta, en la Universidad Autónoma de Nuevo León por el lugar de trabajo y participación en el programa.

Así como a la Secretaría de ciencias humanidades tecnología e innovación (SECIHTI), en el inicio de este posgrado, Conacyt, Por el otorgamiento de beca de manutención para la realización de estudios de posgrado, en este caso, doctorado.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, por su confianza en mí, que dio como resultado esta investigación. De la misma manera, al Dr. José Santos García Alvarado, por la misma confianza y guía durante todo el proceso y desarrollo. Su experiencia y compromiso con la investigación han sido una fuente de inspiración invaluable.

A mi asesor externo, el Dr. Juan Leon, por su apoyo técnico, aportaciones científicas y compartir generosamente su conocimiento. Pero sobre todo por su apoyo no solo técnico, si no como una invaluable guía profesional y personal.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio y maestros de este, por su compañerismo, ideas compartidas y por todos los momentos que hicieron más llevadero el día a día. Especialmente a los estudiantes Brenda Cerino y José Cortés, quienes depositaron su confianza en mi para sacar adelante sus trabajos de tesis, fue una experiencia que indiscutiblemente quedara marcada en mi vida.

Pero, sobre todo, gracias a ti, Andrea Mondragon, mi esposa, quien sin duda fuiste la persona que cargo con todo el peso físico y emocional que conllevo para mi el realizar este doctorado.

A mí, a ti, Axel Ossio, por no rendirte.

## **DEDICATORIAS**

A mí.

Por no rendirme cuando todo parecía cuesta arriba.

Por seguir adelante, incluso con miedo.

Por creer —aunque a veces costara.

A mi esposa,

por su amor, paciencia y fe inquebrantable en mí.

Este logro es tan suyo como mío.

A Dios,

por darme la fuerza en los momentos de debilidad,

la luz en medio de la incertidumbre

y la paz para continuar el camino.

## ÍNDICE

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Contenido                                                                                                     |    |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                                                        | 9  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                        | 10 |
| RESUMEN.....                                                                                                  | 10 |
| ABSTRACT.....                                                                                                 | 12 |
| LISTA DE SÍMBOLOGOS Y ABREVIATURAS .....                                                                      | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN. ....                                                                                         | 14 |
| 2. ANTECEDENTES.....                                                                                          | 16 |
| 2.1 <i>Norovirus (NoV)</i> .....                                                                              | 16 |
| 2.2 <i>Virus de hepatitis A (VHA)</i> .....                                                                   | 17 |
| 2.3 <i>Virus transmitidos por alimentos; Norovirus y virus de hepatitis A, contexto epidemiológico.</i> ..... | 18 |
| 2.4 <i>Dilema de infectividad y su impacto.</i> .....                                                         | 20 |
| 2.5 <i>Métodos de detección en alimentos; estándar RT-qPCR</i> .....                                          | 21 |
| 2.5.1 <i>Cuantificación por RT-qPCR.</i> .....                                                                | 23 |
| 2.5.2 <i>Infectividad indirecta por medio de RT-qPCR.</i> .....                                               | 24 |
| 2.6 <i>Otros métodos de detección.</i> .....                                                                  | 30 |
| 2.6.1 <i>Métodos isotérmicos.</i> .....                                                                       | 30 |
| 2.6.2 <i>Biosensores.</i> .....                                                                               | 31 |
| 2.7 <i>Detección basada en CRISPR.</i> .....                                                                  | 32 |
| 2.7.1 <i>CRISPR SHERLOCK.</i> .....                                                                           | 33 |
| 2.7.2 <i>Detección basada en CRISPR en alimentos.</i> .....                                                   | 34 |
| 3. JUSTIFICACIÓN. ....                                                                                        | 35 |
| 4. HIPÓTESIS.....                                                                                             | 36 |
| 5. OBJETIVO GENERAL.....                                                                                      | 37 |
| 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....                                                                               | 37 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                                                                    | 38 |
| 6.1 <i>Líneas celulares.</i> .....                                                                            | 38 |
| 6.2 <i>Virus</i> .....                                                                                        | 38 |
| 6.3 <i>Extracción de ARN y síntesis de cDNA.</i> .....                                                        | 39 |
| 6.4 <i>Cuantificación por RT-qPCR</i> .....                                                                   | 39 |

|      |                                                                                       |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.5  | <i>Diseño de primers RPA y crARN.</i>                                                 | 41 |
| 6.6  | <i>Amplificación isotérmica de la polimerasa recombinasa (RPA).</i>                   | 42 |
| 6.7  | <i>Detección Cas13a (Un solo paso).</i>                                               | 42 |
| 6.8  | <i>Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la detección mediante CRISPR.</i> | 43 |
| 6.9  | <i>Muestras e inoculación.</i>                                                        | 44 |
| 6.10 | <i>Elución y concentración del virus.</i>                                             | 44 |
| 6.11 | <i>Pretratamiento con ARNasa.</i>                                                     | 45 |
| 6.12 | <i>Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la detección CRISPR.</i>          | 45 |
| 6.13 | <i>Eficiencia de recuperación.</i>                                                    | 46 |
| 6.14 | <i>Análisis estadístico.</i>                                                          | 46 |
| 7.   | <b>RESULTADOS.</b>                                                                    | 48 |
| 7.1  | <i>Diseño de secuencias.</i>                                                          | 48 |
| 7.2  | <i>Detección por RT- qPCR.</i>                                                        | 53 |
| 7.3  | <i>RT-qPCR de muestras de lechuga y mora azul pretratados con y sin ARNasa.</i>       | 53 |
| 7.4  | <i>Detección por RPA.</i>                                                             | 58 |
| 7.5  | <i>Optimización de detección por Cas13a.</i>                                          | 59 |
| 7.6  | <i>CRISPR en muestras de lechuga y mora azul (CRISPR FRESH).</i>                      | 61 |
| 7.7  | <i>Eficiencia de recuperación.</i>                                                    | 64 |
| 8.   | <b>DISCUSIÓN</b>                                                                      | 66 |
| 9.   | <b>CONCLUSIONES.</b>                                                                  | 71 |
| 10.  | <b>PERSPECTIVAS.</b>                                                                  | 72 |
| 11.  | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                   | 73 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Ejemplos de algunos brotes de Norovirus y el virus de Hepatitis A en alimentos.                                                                                            | 19 |
| <b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de algunos de los principales métodos de detección utilizados para virus transmitidos por alimentos.                                                | 22 |
| <b>Tabla 3.</b> Comparación de métodos moleculares propuestos para estimar infectividad.                                                                                                   | 29 |
| <b>Tabla 4.</b> Secuencias utilizadas y diseñadas en este trabajo.                                                                                                                         | 51 |
| <b>Tabla 5.</b> Cuantificación de MNV-1 por qPCR en muestras de lechugas pre-tratadas con ARNasa y sin tratamiento. Porcentaje de recuperación y reducción por tratamiento son mostrados.  | 55 |
| <b>Tabla 6.</b> Cuantificación de MNV-1 por qPCR en muestras de mora azul pre tratadas con ARNasa y sin tratamiento. Porcentaje de recuperación y reducción por tratamiento son mostrados. | 56 |
| <b>Tabla 7.</b> Reducción de MNV-1 en muestras de lechuga inoculadas después del pretratamiento con ARNasa de MNV inactivado por calor.                                                    | 57 |
| <b>Tabla 8.</b> Reducción de MNV-1 en muestras de mora azul inoculadas después del pretratamiento con ARNasa de MNV inactivado por calor.                                                  | 58 |
| <b>Tabla 9.</b> Resumen comparativo entre la detección con y sin ARNasa por medio de RT-qPCR y CRISPR en muestras de lechuga y mora azul.                                                  | 64 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Proceso de obtención de secuencias conservadas de MNV-1 para el diseño de primers de qPCR y región RPA/ CRISPR-Cas13a.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 48 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de ADN de los primers y el diseño del ARNcr. Se indican el objetivo RdRp/Capsid de MNV-1, los primers RPA, los primers qPCR y el ARNcr. El primer forward de RPA contiene el promotor T7. El ARNcr está diseñado para dirigirse al ARN blanco sintetizado a partir de la secuencia 5' de DNA. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 49 |
| <b>Figura 3.</b> Secuencias de VHA de RPA y ARNcr seleccionadas en base al modelo ADAPT para su análisis. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 49 |
| <b>Figura 4.</b> Región consenso conversada entre la secuencia codificante de RdRp y Cápside de norovirus GI genogrupa 1 a 9.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 50 |
| <b>Figura 5.</b> Región de 523 pb se aislado secuenciado de norovirus GI. Dicha region perteneciente a RdRp/cápside fue utilizada como blanco en un ARNcr. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Figura 6.</b> Curva estándar a partir de diluciones del fragmento MNV-1 purificado a partir de un gel y medido con NanoDrop™ 2000. Se utilizó un rango de dilución de 5,06E+09 a 5 copias genómicas / rx como estándares. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 53 |
| <b>Figura 7.</b> Amplificación isotérmica mediante RPA de ARN viral MNV-1 de $5.06 \times 10^9$ (+) y $5.06 \times 10^4$ , $5.06 \times 10^2$ , $5.06$ gc/rx eluidos de muestras de lechuga (A) y mora azul (B) inoculadas, visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Los valores estándar de pares de bases de ADN se enumeran a la izquierda de cada gel. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 58 |
| <b>Figura 8.</b> Evaluación de los rendimientos de la señal fluorescente de un rango de concentraciones de ARNcr (0.025 a 10 $\mu$ M). La concentración de ARNcr de 10 $\mu$ M, en comparación con otras concentraciones, exhibió los mayores rendimientos de señal. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 60 |
| <b>Figura 9.</b> Optimización de la detección basada en Cas13a. (A) La señal de fluorescencia con sustracción de fondo aumentó con el tiempo y alcanzó una meseta aproximadamente a los 120 minutos, pero solo en una mezcla de reacción con todos los reactivos necesarios. (B) El límite de detección fue de 5.06 para la detección con Cas13a del blanco MNV-1; *** $p < 0.001$ . (C) La detección basada en Cas13a detectó MNV-1, pero no los objetivos sintéticos de norovirus HAV, GI y GII y el plásmido que contenía VP6 de rotavirus.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 60 |
| <b>Figura 10.</b> Detección basada en Cas13a de MNV-1 inoculado en lechuga (A) y mora azul (B). En cada panel, se compararon muestras que no fueron tratadas con muestras que fueron tratadas con ARNasa. Las muestras muestran una disminución en la señal de fluorescencia entre las muestras no tratadas y las tratadas con ARNasa (A, B) y una señal fluorescente en la dilución más baja de las muestras tratadas con ARNasa (B). Una señal de $144,05 \pm 107,26$ unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.) fue la señal positiva mínima de nuestro método CRISPR. .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 62 |
| <b>Figura 11.</b> Detección CRISPR de MNV-1 inactivado por calor. (A) MNV-1 tratado por calor detectado por Cas13a en muestras de lechuga tratadas con ARNasa y sin tratar. (B) MNV-1 tratado por calor detectado por Cas13a en muestras de mora azul tratadas con ARNasa y sin tratar. Se muestran las señales de fluorescencia con sustracción de fondo (unidades arbitrarias, u.a.) para diluciones seriadas del control positivo (Pst Ctrl, 11,59 Log10 MNV-1/25 g de alimento) y el control negativo (Ctrl Negativo) en muestras sin tratar (barras negras) y tratadas con ARNasa ONE™ (barras grises). El eje Y de cada gráfico representa la concentración de gc del virus enriquecido por 25 g de alimento. Una señal de $144,05 \pm 107,26$ u.a. fue la señal positiva mínima de nuestro método CRISPR. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Dunnett. ***, $p < 0,001$ . El MNV-1 tratado con ARNasa a 80 °C (control positivo de ARNasa), en comparación con el no tratado, mostró una reducción significativa..... | 63 |

## RESUMEN

Los virus transmitidos por alimentos, en particular norovirus humano (HuNoV por sus siglas en ingles) y el virus de hepatitis A (VHA), representan un grave problema para la industria alimentaria y la salud pública. Son responsables de la mayoría de los brotes de alimentos de origen viral y su detección y/o cuantificación se logra de manera estándar mediante RT-qPCR, sin embargo, algunas limitantes como la presencia de inhibidores en muestras complejas de alimentos y la no discriminación entre partículas infecciosas hacen necesario el desarrollo de nuevas tecnologías de detección sensibles y que informen acerca de la infectividad viral. El uso de tratamientos previos a la detección por RT-qPCR se ha evaluado como un enfoque indirecto para estimar la presencia de partículas infecciosas. Estos tratamientos incluyen compuestos como el propidio monoazida (PMA); estrategias de captura por ligandos, como el uso de mucina porcina gástrica (PGM) o antígenos del grupo sanguíneo (HBGA); el empleo de anticuerpos o aptámeros; así como el uso de enzimas como RNasas y DNasas.. El pretratamiento con RNasa ha sido uno de los más utilizados por su accesible disponibilidad y facilidad de integración con otras tecnologías. La detección basada en CRISPR, particularmente haciendo uso de la enzima Cas13a, es un método de detección rápido, sensible y específico que ha sido recientemente evaluado con éxito en el diagnóstico clínico de distintos agentes infecciosos, entre ellos virales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de detección de norovirus y VHA potencialmente infecciosos en muestras de alimentos por medio de un sistema Cas13a acoplado a RNasa y compararlo con el método estándar basado en RT-qPCR. La implementación de mejores tecnologías de detección permitiría una pronta respuesta en casos de brotes virales de origen alimentario, mejor toma de decisiones por parte de la industria alimentaria con respecto al retiro de productos potencialmente contaminados, así como proveer de mejores herramientas para la prevención efectiva contra estos patógenos.

## ABSTRACT

Foodborne viruses such human norovirus (HuNoV) and hepatitis A virus (HAV) are a major concern for the food industry and public health, representing most of the foodborne outbreak's burden. The RT-qPCR is considered the gold standard for detection and quantification of these viruses in food samples. However, it is known that some PCR inhibitors are present within food samples and this approach cannot distinguish between infectious from non-infectious viruses. Thus, the need to develop more reliable and sensitive methods, at least for the food industry, that informs about infectivity is evidenced. The use of pre-treatments prior to RT-qPCR detection has been evaluated as an indirect approach to detect infectious particles, these include propidium monoazide (PMA), capture by ligands such as gastric porcine mucin (PGM), blood group antigens (HBGA), antibodies or aptamers, as well as the use of enzymes such as RNases and DNases. RNase pre-treatment has been one of the most used due to its availability and ease of integration with other technologies. CRISPR-based detection, particularly using the Cas13a enzyme, is a rapid, sensitive and specific detection method that has recently been successfully evaluated in the clinical diagnosis of various infectious agents, including viral ones. However, its implementation in food samples and viruses associated with, with an infectivity proxy has not been yet evaluated. The aim of this work was to evaluate the feasibility of detecting potentially infectious norovirus and HAV in food samples using an RNase-coupled with the Cas13a system and compare it with the standard RT-qPCR-based method. The implementation of better detection technologies would allow a prompt response in cases of foodborne viral outbreaks, better decision-making by the food industry regarding the recall of potentially contaminated products, as well as providing better tools for effective prevention against these pathogens.

## **LISTA DE SÍMBOLOGOS Y ABREVIATURAS.**

NoV.- Norovirus

HuNoV.- Norovirus humano

VHA.- Virus de Hepatitis A

PMA.- Propidio de monoazida

EMA.- Etidio de monoazida

PtCl<sub>4</sub>.- Cloruro de platino

RT-qPCR.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

CRISPR.- repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas, por sus siglas en ingles

SHERLOCK. - desbloqueo de reportero enzimático de alta sensibilidad específico, por sus siglas en inglés

ORF.- Marco de lectura abierto (Open Reading frame)

MNV.- Norovirus murino

RPA.- Amplificación por recombinasa polimerasa

T7.- Transcripción mediada por polimerasa T7

CV.- Coeficiente de variación

LOD.- Limite de detección

LOQ.- Limite de cuantificación

Gc.- Copias genómicas

Cq.- Ciclo de cuantificación

ARNcr.- guía de CRISPR de ARN

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades transmitidas por virus son un problema cada vez mayor a nivel mundial. Existe una creciente preocupación por aquellos virus transmitidos por alimentos como lo son el norovirus humano y el virus de hepatitis A, que se transmiten principalmente por vía fecal-oral, ya sea por contacto de persona a persona, fómites o por ingestión de agua y alimentos contaminados (Koopmans et al., 2002). A nivel mundial, el número de brotes asociados al consumo de productos agrícolas ha aumentado; por ejemplo, entre 1998 y 2013, hubo un total de 972 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con productos frescos tan solo en los Estados Unidos (Fiore, 2004; Tian et al., 2017). En 2016 de todos los reportes de brotes virales asociados con productos frescos a nivel mundial, solo el norovirus humano y el virus de hepatitis A representaron el 48.7% y 46.1% respectivamente (Chatziprodromidou et al., 2018). Dado que estos brotes son importantes en la salud pública y una carga económica, se pone en evidencia la necesidad de mejores prácticas de inocuidad alimentaria, incluida la detección de estos patógenos a fin de contar con medidas de prevención más adecuadas.

Dos pasos críticos para poder identificar de manera exitosa la presencia de norovirus y VHA en alimentos son la elución del virus de la matriz y la detección viral. La elución de estos virus a menudo es difícil porque las muestras de alimentos con frecuencia tienen baja carga viral y, por lo tanto, se requieren equipos de concentración como filtración, y métodos específicos de elución (Trudel-Ferland et al., 2024). Además, para la detección de estos virus en alimentos, no basta solo con saber si están o no presentes, sino también si son o no infecciosos. Esto último se complica por la ausencia de un método de cultivo celular confiable, en el caso de norovirus y los bajos niveles de contaminación en las muestras de alimentos. Debido a la baja dosis infectiva de norovirus (~18 partículas virales) y VHA (desde 1 hasta 100 partículas virales), los alimentos que contienen pequeñas cantidades de virus pueden representar un riesgo para el consumidor, por lo que contar con métodos de detección de alta sensibilidad y además informen acerca de la infectividad es crucial (Grabow, 1997; Teunis, Moe, Liu, Miller, et al., 2008; Yezli & Otter, 2011). Para sobrepasar esta limitación (determinación de infectividad) se han explorado numerosas alternativas donde se destacan: el uso de agentes intercalantes para

viabilidad genómica (ej. PMA, PMAxx, EMA, PtCl<sub>4</sub>), de integridad de cápside (ej. ARNasas, proteinasas), los basados en captura por ligandos (ej. Anticuerpos, aptámeros, HGBA, mucina gástrica porcina) o validación por otros sistemas de cultivo. De esto último, en el caso de norovirus humano destacan los cultivos de células madre, embriones usando el modelo *Danio rerio* (Pez cebra) y más recientemente por cultivo de organoides entéricos (Costantini et al., 2018; Liu & Moore, 2020a; Manuel et al., 2018; Tan et al., 2023).

Hasta la fecha, el método por RT-qPCR ha sido el método de detección utilizado debido a su sensibilidad y especificidad, convirtiéndose en el estándar de oro para la detección y cuantificación de la carga viral en alimentos. Sin embargo, este ensayo tiene limitaciones en cuanto a costo, tiempo de ejecución y requerimientos de infraestructura específicos (ej. Termocicladores de tiempo real y costosos reactivos de biología molecular) y aún más importante, no brinda información acerca de la infectividad del virus al solo detectar material genómico. Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico y detección innovadores para detectar ácidos nucleicos utilizando la tecnología de edición de genes CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas, por sus siglas en inglés). Esta es una herramienta de edición del genoma de origen bacteriano que forma parte de su llamado “sistema inmunológico bacteriano”, que se utiliza para contrarrestar virus invasores y que ha sido utilizado como herramienta para modificar genes en células vivas con diversas aplicaciones. En 2017, un grupo de científicos informó sobre el desarrollo de una tecnología llamada SHERLOCK (desbloqueo de reportero enzimático de alta sensibilidad específico, por sus siglas en inglés) diseñada para detectar rápidamente ácidos nucleicos de tipo ARN con alta sensibilidad, especificidad de base única e incluso en una plataforma portátil. SHERLOCK utiliza una proteína Cas13a, que se une y escinde el ARN en lugar de los sustratos de ADN. Después de que Cas13a, con ayuda de un guía de ARN detecta su ARN objetivo, adopta un estado enzimáticamente "activo" en lugar de volver a un estado inactivo, como Cas9. Luego, al activarse Cas13a escinde ARN independientemente de la homología, permitiendo el corte de moléculas de ARN reporteras. Esto se conoce como "escisión colateral". Es esta propiedad de Cas13a la que abre la posibilidad de utilizar Cas13a como herramienta de diagnóstico, y de ahí la presente propuesta de trabajo.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 *Norovirus (NoV)*.

*Norovirus* es un género de virus sin envoltura con forma icosaédrica, perteneciente a la familia *Caliciviridae*. Su genoma está compuesto por una única cadena de ARN de sentido positivo de 7.5 kb de longitud, dividida en tres marcos de lectura abiertos (ORF1-3) (Hardy, 2005). El ORF1 codifica una poliproteína, dividida a su vez en seis proteínas virales no estructurales (NS1-2/NS7), que incluyen la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El ORF2 y el ORF3 codifican la proteína de estructura viral principal (VP1) y la segunda proteína de estructura menor (VP2), respectivamente (Chan et al., 2017). Hasta el momento, se han identificado diez genogrupos (GI-GX) basados en la secuencia VP1, todos con diversos hospedadores, incluyendo humanos (GI, GII, GIV), especies bovinas y caprinas (GIII), roedores (GV), cánidos y félidos (GIV, GVI y GVII) y murciélagos (GX) (Chhabra et al., 2019). Estos genogrupos dan lugar a 49 genotipos para la cápside: 9 para GI, 27 para GII, 3 para GIII, 2 para los genogrupos GIV, GV y GVI, y 1 para GVII, GVIII, GIX y GX. Recientemente, los norovirus se han categorizado utilizando las regiones codificantes de la polimerasa viral, conocida como clasificación de tipo P, lo que ha dado lugar a más de 60 tipos de RdRp (Parra, 2019). Las cepas de norovirus humano GII.4 son la principal causa de brotes, contribuyendo en ocasiones, y dependiendo del lugar con hasta el 80% de las infecciones por norovirus humano, sin embargo, el genogrupo GI de norovirus humano es el que se ha establecido como el más frecuente en reportes específicamente de alimentos (J. Gao et al., 2024; Lindesmith et al., 2008). La mayoría de los casos de norovirus humano en alimentos se deben al consumo, mas no limitado a, de mariscos, bayas o berries y vegetales de hoja verde (Patel et al., 2009; Teunis et al., 2008, Lane et al., 2019; Robilotti et al., 2015; Velebit et al., 2019). Se han reportado varias vías de transmisión de estos virus, como contacto persona a persona, el consumo de alimentos contaminados, fómites, agua o partículas de vómito en aerosol. Varios estudios han demostrado que las fuentes más comunes de los brotes de norovirus humano son los mariscos, agua y los alimentos listos para consumo contaminados (Hewitt et al., 2009). La infección por norovirus humano, puede ser asintomática, sin embargo, en los casos sintomáticos suele manifestarse como vómitos de inicio agudo con diarrea acuosa no sanguinolenta, después de un período de incubación de alrededor 48 h., otros

síntomas incluyen náuseas, calambres abdominales y, en ocasiones, fiebre baja (Robilotti et al., 2015). Se estima que la infección humana por norovirus provoca anualmente casi 700 millones de casos y 220,000 muertes en el mundo (Bartsch et al., 2016). En general, el norovirus humano posee una baja dosis infecciosa (18 partículas virales aproximadamente, aunque puede variar dependiendo del genogrupo) (Teunis et al., 2008).

## 2.2 *Virus de hepatitis A (VHA).*

El virus de hepatitis A pertenece al género *Hepatovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Entre los siete genotipos de VHA que se han reconocido, tres genotipos infectan a los seres humanos (I, II y III) (Desbois et al., 2010b). Es un virus pequeño, de 27 a 32 nm de diámetro, con un genoma de ARN monocatenario lineal de polaridad positiva de aproximadamente 7.5 kb de longitud (Gholizadeh et al., 2023). Existen dos formas del virus; viriones sin envoltura, que se excretan en las heces y los viriones cuasienvueltos (eVHA), que se secretan de forma no lítica a partir de las células infectadas. El eHAV se encuentra en la sangre de pacientes infectados o en el sobrenadante de cultivos celulares infectados (Lemon et al., 2018). El genoma del virus de hepatitis A consta de dos regiones no codificantes en cada extremo (5' y 3'). A su vez esta se compone de 3 regiones codificantes; región P1 codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y una supuesta VP4, y las regiones P2 y P3 codifican proteínas no estructurales asociadas con la replicación. La estructura de la cápside está altamente conservada y solo existe un serotipo humano. Sin embargo, según el análisis de un segmento de 168 nucleótidos de la región VP1-2A, se clasifica en seis genotipos. Los genotipos I, II y III son de origen humano y se dividen en los subtipos A y B (Desbois et al., 2010a; Randazzo & Sánchez, 2020).

El virus de hepatitis A no causa enfermedad hepática crónica, si no que más bien es autolimitante y se transmite por vía fecal-oral. La transmisión también ocurre a través de los alimentos y el agua donde se puede persistir durante mucho tiempo, entre usuarios de drogas inyectables y rara vez a través de hemoderivados infectados. Las ostras, almejas, mejillones, lechugas, cebollas verdes, frambuesas y fresas han sido vehículos importantes también (Velebit et al., 2019). Puede causar insuficiencia hepática aguda, que puede ser mortal. La infección se caracteriza generalmente por un inicio agudo y signos tempranos,

como febrícula, malestar general, mialgia y vómitos (Shukla et al., 2018; Yekta et al., 2021). Se estima que anualmente resulta en aproximadamente 1.5 millones de casos clínicos en todo el mundo, y la muerte ocurre en aproximadamente el 0.2% de ellos; sin embargo, las estadísticas reales de personas infectadas son aproximadamente 10 veces más altas debido a la falta de información (Hewitt et al., 2009). Un número relativamente bajo de partículas virales (10 a 100) puede causar infección en humanos (Grabow, 1997). El período de incubación generalmente varía entre 15 y 50 días, tiempo en donde las personas infectadas pueden eliminar virus. La prevalencia del virus se correlaciona con el saneamiento, la falta de disponibilidad de agua potable y condición socioeconómica (Agrawal et al., 2019). La mayoría de los brotes tienen lugar durante la preparación de alimentos debido a contaminación cruzada por el manipulador. La disminución de los casos por el virus de hepatitis A puede ser factible mediante medidas de control adecuadas como saneamiento, mejora en la producción de alimentos, la vacunación periódica del personal en riesgo y la detección temprana de posibles riesgos (Shah et al., 2020).

### *2.3 Virus transmitidos por alimentos. Norovirus y virus de hepatitis A, contexto epidemiológico.*

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el número de enfermedades transmitidas por alimentos en un periodo de 2007 a 2015 ascendió en un alrededor de 600 millones, donde tan solo el norovirus humano represento el 20% de estos (120 millones) y el virus de hepatitis A el 2% (14 millones) (Bosch et al., 2018; Havelaar et al., 2015). En 2008, la OMS clasificó a los vegetales de hoja verde (ej. Lechuga de diversas variedades) como el producto de principal preocupación y a las bayas o “moras” como se les conoce comúnmente, como la segunda en términos de inocuidad alimentaria desde una perspectiva mundial (OMS, 2008). Con respecto a los vegetales de hoja verde la prevalencia de norovirus y el virus de hepatitis A ha sido complicada de cuantificar a nivel mundial. Esto debido a la diversidad de brotes, naturaleza de la muestra y disposición geográfica, donde, por ejemplo, puede estar presente en productos listos para consumo, en puntos de venta o “retail”. En Egipto por ejemplo, se contempla una prevalencia del 30% de norovirus en productos de hoja verde, mientras que del virus de hepatitis A fue de 31.2% y para moras fue del 48% y 40% en el caso del virus de hepatitis A y norovirus respectivamente, todo esto en punto de venta en un periodo de un año (Elmahdy et al.,

2022). Otro estudio entre 2013 y 2014 en Australia reportó una prevalencia de no más del 2.2% tanto para norovirus y el virus de hepatitis A en vegetales de hoja verde y moras (Torok et al., 2019). Se presentan algunos ejemplos más en la **tabla 1**. Entre 1983 y 2018 el virus de hepatitis A y norovirus humano fueron causales principales, representando más del 80% de los brotes relacionados con moras en el mundo, los brotes fueron reportados por 18 países diferentes. Las investigaciones epidemiológicas señalaron fuentes de contaminación provenientes de productores en muchos países, siendo los más frecuentemente involucrados Polonia, China y la República de Serbia (Bozkurt et al., 2021; WHO, 2018). Aunque anualmente se reportan casos clínicos por enfermedad de hepatitis A, en México actualmente no se cuenta con un sistema de vigilancia para norovirus humano y virus de hepatitis A en alimentos.

Los alimentos juegan un papel clave en la transmisión de virus patógenos. Estos pueden contaminar una amplia variedad de matrices en donde pueden permanecer infecciosos por semanas (Stals et al., 2012). La contaminación de los alimentos puede ocurrir de tres formas principales: 1) durante el proceso de producción, y donde la contaminación del agua juega un papel preponderante (Ceylan et al., 2020; Le Guyader et al., 2008), 2) manipuladores de alimentos infectados que no han observado buenas prácticas de higiene (Ceylan et al., 2020) y 3) consumo de productos de origen animal que contienen virus zoonóticos.

**Tabla 1.** Ejemplos de algunos brotes de Norovirus y el virus de Hepatitis A en alimentos.

| Año/ lugar                                    | Alimento asociado                                                           | Patógeno/ Tasa de positivos                                                                                                                                                           | Referencia          |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| De marzo de 2015 a abril de 2017, Reino Unido | Productos frescos (frambuesas y lechuga) productos congelados (frambuesas). | NoV humano se detectó en el 5.3% (30/568) de las muestras de lechuga, el 2.3% (7/310) de las muestras de frambuesa fresca y el 3.6% (10/274) de las muestras de frambuesa congeladas. | (Cook et al., 2019) |

|                                          |                                                                  |                                                                                                                                                                |                           |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Enero de 2016 a diciembre de 2017, China | Bayas frescas/ congeladas (fresas, arándanos, frambuesas, moras) | Se detectó NoV en el 9% (81/900) de las muestras de bayas congeladas y en el 12.1% (109/900) de las frescas que se venden al por menor en el mercado nacional. | (X. Gao et al., 2019)     |
| Finlandia, 2006                          | Vegetales crudos, lechuga entre ellos.                           | Mas de 400 casos de Norovirus                                                                                                                                  | (Makary et al., 2009)     |
| Estados Unidos, 2001-2008                | Vegetales de hoja verde y frutos (moras) congelados              | 2,922 casos de Norovirus                                                                                                                                       | (Hall et al., 2012)       |
| Corea del Sur, 2008                      | Ensaladas en escuelas.                                           | 131 casos de Norovirus                                                                                                                                         | (Yu et al., 2010)         |
| Finlandia, 2009.                         | Frambuesas                                                       | 200 casos de NoV                                                                                                                                               | (Maunula et al., 2009)    |
| China, 2012                              | Pan                                                              | 87 casos de NoV                                                                                                                                                | (Guo et al., 2014)        |
| 2015, China                              | “Moras” mixtas                                                   | 4 casos de HAV                                                                                                                                                 | CDC. 2018                 |
| 2016, Egipto                             | congeladas.                                                      | 143 casos de HAV                                                                                                                                               |                           |
| 2017, China                              |                                                                  | 24 casos de HAV                                                                                                                                                |                           |
| 2018, Polonia                            |                                                                  | 17 casos de HAV                                                                                                                                                |                           |
| 2010, Francia                            | Tomates semi secos                                               | 59 casos de HAV                                                                                                                                                | (Gallot et al., 2011)     |
| 2010, Países bajos                       | Tomates semi secos                                               | 13 casos de HAV                                                                                                                                                | (Petrignani et al., 2010) |
| 2011, Inglaterra                         | Tomates semi secos                                               | 237 casos de HAV                                                                                                                                               | (Carvalho et al., 2012)   |
| 2013-2014, Italia                        | Moras congeladas                                                 | 1,102 casos de HAV                                                                                                                                             | (Severi et al., 2015)     |

#### 2.4. Dilema de infectividad y su impacto.

A nivel global, la industria alimentaria se mantiene preocupada por los sistemas de vigilancia actuales, ya que los métodos estándar de detección viral en alimentos (RT-qPCR) detectan el ARN viral pero no el virus infeccioso. Esto es particularmente problemático para la industria e indirectamente para el ámbito clínico; los costos anuales

de atención médica y la pérdida de productividad debidos a la infección por norovirus humano, por ejemplo, alcanzan los 60,000 millones de dólares a nivel mundial (CDC, 2024). Dicha problemática radica en el hecho en que el ARN viral, particularmente el del norovirus humano y el del virus de hepatitis A, puede persistir en el medio ambiente y no representar un riesgo real a la salud. Varios estudios han destacado la limitación de basarse únicamente en la detección del ARN viral, ya que tiende a sobreestimar la presencia de partículas virales infecciosas en una muestra. Por ejemplo, en un estudio con voluntarios humanos, se exploró la correlación entre los resultados de la detección de ARN por RT-qPCR de norovirus humano en moras. Ninguno de los veinte participantes reportó síntomas similares a una infección por norovirus humano después de seis consumos independientes, sin embargo, 28 muestras resultaron positivas (Eshaghi Gorji et al., 2021). Otro estudio, donde se realizó un análisis exhaustivo de varios tipos de productos frescos, incluyendo 867 muestras de vegetales de hoja verde, 180 muestras de moras y 57 muestras de otras variedades de productos frescos como tomates, pepinos y ensaladas de frutas, reveló la detección de norovirus humano por RT-qPCR en el 19.5% de las muestras, pero, al confirmar por secuenciación estas muestras positivas, solo el 34.6% (del total de 19.5%) fueron confirmadas (Baert et al., 2011a). Con el aumento de sensibilidad de una determinada metodología de detección, existe una creciente preocupación sobre la interpretación de los resultados positivos de amplificación por RT-qPCR. Se deben desarrollar estrategias para confirmar los resultados mediante RT-PCR en tiempo real, de forma similar a la detección de patógenos microbianos en alimentos. La detección podría indicar contacto con algún patógeno viral en la cadena de producción de productos frescos, por lo cual no se puede descartar un riesgo potencial de infección, pero aún se desconoce el riesgo real de los productos con resultados positivos de NoV mediante RT-qPCR. Por lo tanto, una señal RT-qPCR positiva de los métodos de detección viral estándar (ISO 15216-2:2019, capítulo 26 de la FDA BAM) no representa un virus intacto y funcional, puede no provocar enfermedad y no debería ser la única base para retiros del mercado.

## *2.5 Métodos de detección en alimentos; estándar RT-qPCR.*

La mayoría de los métodos que se utilizan actualmente para la detección de virus transmitidos por los alimentos se basan en RT-qPCR ya que es sensible y requiere tiempos

de análisis más cortos que los métodos basados en cultivos celulares (Bosch et al., 2018). Sin embargo, a pesar de ser el estándar de oro, la RT-qPCR y otros métodos de detección comunes en la industria alimentaria derivados de la misma tienen sus ventajas y desventajas (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de algunos de los principales métodos de detección utilizados para virus transmitidos por alimentos.

| Método                                | Ventajas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Desventajas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Referencias                                   |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Método ISO / CEN</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Se incluyen los principales virus y matrices alimentarias.</li> <li>Mayor confianza en los resultados debido al uso de controles y descripción detallada de cómo interpretar los resultados.</li> <li>El reconocimiento internacional de un método ISO aumenta la implementación de un método armonizado en los laboratorios.</li> <li>Introduce la posibilidad de comparar y evaluar resultados de diferentes laboratorios.</li> <li>Facilita la acreditación de laboratorios para pruebas de virus.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>No incluye métodos para matrices de alimentos procesados.</li> <li>El elevado número de controles aumenta los costos.</li> <li>Deben estar disponibles controles comerciales.</li> <li>Puede conducir a la no detección de niveles bajos de virus en algunas matrices específicas.</li> <li>No se puede distinguir entre partículas infecciosas y no infecciosas.</li> <li>Complejidad del método.</li> </ul> | (Perrin et al., 2015)                         |
| <b>Cuantificación y confirmación.</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>La cuantificación de rutina proporciona datos sobre los niveles de referencia de virus en matrices alimentarias e informará la implementación de niveles aceptables.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>La cuantificación por RT-qPCR es sensible a los inhibidores y tiene una precisión poco confiable para niveles bajos de virus.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                      | (Baert et al., 2011b; L. Müller et al., 2015) |

|                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La confirmación sistemática de los resultados de RT-qPCR mediante secuenciación proporciona información sobre la epidemiología de las cepas del virus.</li> </ul>                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La confirmación de los resultados positivos de RT-qPCR mediante secuenciación es difícil debido a la baja sensibilidad.</li> <li>• La cuantificación y la confirmación aumentan el costo.</li> </ul>                                                                                                                                              |                                                     |
| <b>Detección de virus molecular a partir de cápsides de virus intactas</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce la sobreestimación del número de partículas de virus infecciosos.</li> </ul>                                                                                                                                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Es necesario desarrollar una amplia gama de reactivos.</li> <li>• Necesita una evaluación cuidadosa de los protocolos según el tipo de virus y matrices.</li> <li>• Deben incluirse controles infecciosos y no infecciosos.</li> </ul>                                                                                                            | (Escudero-Abarca et al., 2014; Moreno et al., 2015) |
| <b>ICC-RT-PCR</b>                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite la detección de virus infecciosos.</li> <li>• Más sensible que el cultivo celular solo.</li> <li>• Detecta virus infecciosos que no muestran efecto citopático.</li> <li>• Acorta el tiempo de análisis en comparación con el cultivo celular solo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los virus entéricos de tipo salvaje son generalmente difíciles de cultivar.</li> <li>• Es necesario optimizar un sistema de cultivo simple para NoV.</li> <li>• El cultivo aumenta el costo y el tiempo necesarios para el diagnóstico.</li> <li>• No es cuantitativo a menos que se utilice como prueba de número más probable (MPN).</li> </ul> | (Ryu et al., 2018)                                  |

### 2.5.1 Cuantificación por RT-qPCR.

La cuantificación de partículas virales mediante la técnica de RT-qPCR se puede realizar utilizando una curva estándar generada a partir de cantidades conocidas de la secuencia diana representada por ARN o ADN transcrito sintético o *in vitro* (Costafreda et al., 2006; Da et al., 2014; Gentry et al., 2009). Independientemente del método utilizado, el paso más crítico es la transcripción inversa (RT), siendo el ARN la opción óptima como control de amplificación externo (Costafreda et al., 2006). Sin embargo, la producción y cuantificación de materiales estándar por laboratorios individuales puede dar lugar a diferencias entre las intersecciones de la curva estándar y, por tanto, inducir una variación entre laboratorios, sugiriendo que el uso de reactivos estándar certificados puede reducir la variación. Los estudios entre laboratorios (comparativos) y el uso de varios reactivos y sistemas de RTq-PCR para cuantificar niveles bajos de virus (por ejemplo, <100 copias del genoma/g) pueden conducir a una variabilidad de los resultados, por ejemplo, diferentes valores de umbral del ciclo (Ct, del inglés cycle threshold) obtenidos por varios laboratorios (Costafreda et al., 2006; Da et al., 2014; Gentry et al., 2009).

Es importante destacar que los virus a menudo se distribuyen de manera desigual en una matriz de alimento, por lo que es necesario analizar un conjunto de muestras para obtener resultados más confiables (Gentry et al., 2009; A. Müller et al., 2017). Actualmente, no se aplican criterios microbiológicos regulatorios (por ejemplo, normas, directrices o especificaciones) en relación con la detección de virus. La mayoría de las empresas y autoridades alimentarias solicitan ensayos cualitativos como parte de las pruebas de rutina de su control de calidad o en investigación de brotes (A. Müller et al., 2017). Sin embargo, para confirmación de una señal RT-qPCR positiva y para ayudar en los estudios epidemiológicos, se recomienda la tipificación sistemática de cepas vinculadas a los brotes y la vigilancia de virus en productos alimenticios.

### *2.5.2 Infectividad indirecta por medio de RT-qPCR.*

El estudio de norovirus humano se ha limitado por la falta de un sistema eficiente de cultivo celular en modelos animales. Esta ausencia ha llevado a utilizar virus subrogados como el norovirus murino, el virus de Tulane o el calicivirus felino que sí pueden crecer en laboratorio, aunque sus características no siempre reflejan fielmente las del norovirus humano. A pesar de que se han identificado varios de estos virus que permiten evaluar la

capacidad infectiva mediante técnicas como ensayos de formación de placas o dosis infecciosa del cultivo de tejidos al 50% (TCID<sub>50</sub>, del inglés Tissue Culture Infectious Dose 50%), su uso sigue siendo una aproximación indirecta. En los últimos años, ha habido progresos importantes en el cultivo del norovirus humano, pero las metodologías aún no se consideran lo suficientemente prácticas para un uso generalizado. Como se mencionó anteriormente, las técnicas basadas en RT-qPCR presentan una limitación fundamental: no diferencian entre virus activos e inactivos. Esto se debe a que amplifican todo el ARN presente, ya sea libre, parcialmente degradado, envuelto en cápsides dañadas o con mutaciones que impiden la replicación. Esta ambigüedad genera dificultades a la hora de interpretar los resultados, especialmente en estudios de prevalencia o al analizar la eficacia de métodos de inactivación. Con el reconocimiento creciente del impacto del norovirus humano en enfermedades transmitidas por alimentos, también ha aumentado la preocupación por este problema, conocido como el “dilema de la infectividad”.

Actualmente, no existe un método universalmente aceptado para evaluar la infectividad del norovirus humano. Sin embargo, se han investigado varias técnicas moleculares avanzadas basadas en ácidos nucleicos como el uso de long-template RT-PCR, el empleo de intercalantes bloqueadores de transcripción, pretratamientos enzimáticos o la incorporación de etapas de unión a receptores celulares. Es importante dejar en claro que ninguna de estas técnicas logra replicar completamente los resultados observados con virus sustitutos cultivables en estudios de inactivación, aunque muchas de ellas sí permiten eliminar una fracción considerable de las partículas no infecciosas por lo que se suele referir a estas como indicador de infectividad.

#### *2.5.2.1 Long-template RT-qPCR.*

La técnica long-template RT-PCR ha sido explorada por su posible utilidad en evaluar la integridad del genoma, permite amplificar segmentos extensos del ARN del norovirus. A diferencia de la RT-qPCR convencional, que solo se enfoca en una pequeña región conservada para cuantificar el ARN viral, esta estrategia considera la posibilidad de que otras partes del genoma puedan estar dañadas sin que eso se refleje en una reducción del título detectado (Kostela et al., 2008). Se ha observado que distintas regiones del genoma pueden responder de manera desigual frente a tratamientos de inactivación, como la

radiación UV, por lo que el daño genómico no sigue un patrón aleatorio como el descrito por la distribución de Poisson (Pecson et al., 2009). En el caso de norovirus, se ha logrado amplificar prácticamente todo el genoma del genotipo GII (7,300 nucleótidos aproximadamente) utilizando esta técnica (Kostela et al., 2008). No obstante, el método presenta serias limitaciones: su eficiencia y sensibilidad son bajas, el proceso es lento y la amplificación de fragmentos tan largos resulta técnicamente demandante. Además, Seo et al., 2012 mostraron que esta técnica subestima significativamente la reducción de virus sustitutos infecciosos (como MNV y MS2) tras tratamientos térmicos, salinos o con variaciones de pH, lo que sugiere que también se amplificó ARN proveniente de partículas no viables. Esto podría explicarse porque el método no discrimina si el ARN está contenido dentro de cápsides dañadas o con mutaciones letales.

#### *2.5.2.2 Agentes intercalantes.*

Los agentes intercalantes como los colorantes fotoactivables propidio monoazida (PMA) y etidio monoazida (EMA), se han utilizado para estimar la viabilidad tanto de bacterias (ej. *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) como de ciertos virus, incluyendo el bacteriófago MS2, el virus de hepatitis A y norovirus (Kim & Ko, 2012). Estos compuestos, al ser activados mediante luz visible, generan radicales nitrilo altamente reactivos que se unen covalentemente al material genético, impidiendo así su posterior amplificación por PCR. Como los intercalantes no penetran membranas celulares ni cápsides virales intactas, solo actúan sobre ácidos nucleicos expuestos debido a daño estructural. Al aplicar un tratamiento con PMA antes de una RT-qPCR, es posible reducir parcialmente la detección de virus no infecciosos.

Aunque esta estrategia ha sido empleada para intentar distinguir entre partículas virales activas e inactivas, su eficacia puede ser variable y no siempre confiable. Por ejemplo, se ha demostrado que la combinación de RT-PCR con pretratamiento de PMA permite diferenciar ARN viral libre de partículas virales íntegras (como MNV-1 y norovirus), pero no logra distinguir adecuadamente entre norovirus infecciosos e inactivos, sin importar el tipo de tratamiento recibido (Randazzo et al., 2016). En otro estudio, se observó que la RT-qPCR acoplada con EMA subestimó la reducción del genotipo GII.4 de norovirus

humano cuando se utilizó plasma frío como método de inactivación (Aboubakr et al., 2020). Actualmente existen versiones mejoradas de estos colorantes, como PMAxx y PEMAX, y se ha reportado que PMAxx tiene un desempeño superior frente a sus predecesores en la evaluación de la infectividad de norovirus. De acuerdo con Randazzo et al., 2016, el uso de PMAxx en combinación con un surfactante (Triton X-100) permitió diferenciar entre partículas infecciosas y virus inactivados térmicamente, observando reducciones en la señal de RT-PCR de entre 1.4 y más de 2 logaritmos. Además, este enfoque puede incorporarse sin dificultad a protocolos establecidos, como la norma ISO 15216, para la detección de norovirus humano o el virus de hepatitis A en alimentos y agua. No obstante, esta metodología presenta limitaciones teóricas: no detectaría partículas que, aunque contengan daños o mutaciones letales en el dominio P, conserven una cápside aparentemente intacta. Este mismo problema se plantea también para otras estrategias como los pretratamientos enzimáticos. Por tanto, aún se requiere mayor investigación para validar plenamente la utilidad de estos métodos en la evaluación de la infectividad del norovirus.

#### *2.5.2.3 Tratamientos enzimáticos.*

Los pretratamientos enzimáticos combinado con métodos de detección basados en ácidos nucleicos, ha sido propuesto como una estrategia prometedora para evaluar la infectividad del norovirus humano y del virus de hepatitis A. Esta aproximación, puede utilizar una mezcla de proteinasa K y ARNasa. Nuanualsuwan & Cliver, 2002 propusieron, con el objetivo de reducir los falsos positivos, el eliminar cápsides virales dañadas y ARN viral libre mediante estos pretratamientos. Lamhoujeb et al., 2008. reportaron que al aplicar este tratamiento junto con la técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, por sus siglas en ingles) en tiempo real, no se detectaron señales falsas en muestras de calicivirus felino ni de norovirus humano sometidas a tratamiento térmico. Sin embargo, aún se requiere una evaluación más amplia sobre su eficacia frente a diferentes variantes virales y métodos de inactivación. Un aspecto por considerar es que, aunque el tratamiento con ARNasa permite eliminar el ARN de virus con cápsides comprometidas sin afectar partículas intactas, su especificidad no es absoluta. Fragmentos de ARN de bajo peso molecular o complejos ribonucleoproteicos (RNPs) pueden seguir

siendo amplificados por RT-PCR. Además, se ha observado que estos RNPs, resistentes a la ARNasa, pueden liberarse de partículas de HuNoV tras exposiciones térmicas moderadas (por ejemplo, 45 °C durante 1.5 minutos), lo que sugiere que la cápside parcialmente dañada puede seguir ofreciendo cierta protección al material genético. Sánchez et al., 2012 obtuvieron una reducción de 0.55 logaritmos en el virus de hepatitis A térmicamente inactivado a partir de un inóculo de  $3.12 \pm 0.03$  log PCRU.

Un desafío técnico radica en la combinación de ambas enzimas. La proteinasa K puede degradar a la ARNasa si no se estabiliza adecuadamente, lo que suele requerir la presencia de iones calcio (1 mM). Por esta razón, algunos estudios han propuesto aplicar las enzimas en etapas separadas (primero proteinasa K y luego ARNasa A), lo que ha demostrado mejorar la capacidad para reducir señales no específicas en comparación con la estrategia de un solo paso. No obstante, incluso este enfoque secuencial no logra eliminar completamente los falsos positivos.

#### *2.5.2.4 Ligandos.*

Entre las distintas estrategias basadas en ácidos nucleicos para la detección de virus infecciosos, la incorporación de una etapa de unión con ligandos antes de la RT-qPCR se ha consolidado como una de las más utilizadas. Este enfoque se ha destacado por su rapidez y sensibilidad al permitir la exclusión de partículas virales no infecciosas. En esta técnica, se emplean microesferas magnéticas recubiertas con diferentes ligandos, como PGM (mucina porcina), HBGAs, anticuerpos o aptámeros, que capturan específicamente las partículas virales presentes en la muestra.

Cannon & Vinjé, 2008 demostraron que al usar microesferas conjugadas con antígenos H tipo 1 y aplicar posteriormente RT-qPCR, fue posible detectar cantidades tan bajas como 30 a 300 copias genómicas de norovirus en aguas ambientales. Dancho et al., 2012, propusieron el uso de microesferas recubiertas con PGM (PGM-MB) en conjunto con RT-qPCR como una herramienta para diferenciar entre virus infecciosos y no infecciosos. Esta propuesta se basó en la observación de una menor capacidad de unión a PGM por parte de virus tratados con métodos de inactivación como radiación UV, calor o alta presión. Sin embargo, la eficacia de esta metodología depende tanto de la cepa como del tratamiento de inactivación aplicado. De manera interesante, Moore et al., 2016

observaron que el aptámero M6-2 mostraba una afinidad de unión dependiente de la integridad de la cápside viral similar a la de los HBGAs, lo que lo posiciona como una alternativa viable para detectar partículas virales completas. Al utilizar ligandos específicos, como anticuerpos, PGM o HBGAs, se logra capturar únicamente partículas virales con blanco de cápside intacto, lo cual reduce la detección de ARN libre de virus inactivados. A pesar de sus ventajas, esta técnica no permite diferenciar completamente entre virus infecciosos y no infecciosos con genomas letalmente dañados o mutados, ya que su eficacia está estrechamente ligada a la especificidad del ligando utilizado. La falta de ligandos con amplia reactividad también limita su aplicabilidad para la detección de la diversidad de cepas de norovirus.

Como todas las técnicas, estas alternativas moleculares como indicadores de infectividad tienen ventajas y desventajas (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Comparación de métodos moleculares propuestos para estimar infectividad.

| <b>Técnica</b>                              | <b>Principio</b>                                                         | <b>Ventajas</b>                                                                | <b>Limitaciones</b>                                                                                                 | <b>Notas</b>                                                                                           |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RT-PCR de fragmento largo</b>            | Amplifica regiones extensas del genoma viral para evaluar su integridad  | Puede reflejar daño genómico no detectado por RT-qPCR convencional             | Baja eficiencia, sensibilidad limitada, laboriosa; puede amplificar RNA no infeccioso contenido en cápsides dañadas | No sigue distribución de Poisson en tratamientos como UV; útil para estudios genómicos, no para rutina |
| <b>RT-PCR con intercaladores (PMA, EMA)</b> | Bloquea la amplificación de RNA libre o expuesto tras activación con luz | Elimina parcialmente la señal de virus no infecciosos; PMAxx mejora resultados | Inconsistente según la matriz o el virus; no diferencia virus con cápside intacta, pero genoma no funcional         | PMAxx + Triton X-100 mejora especificidad; compatible con ISO 15216                                    |

|                                                          |                                                                                    |                                                                                           |                                                                                                      |                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pretratamiento enzimático (Proteinasa K/ ARNasa )</b> | Degrada RNA y cápsides dañadas antes de la detección                               | Disminuye falsos positivos; simple de implementar                                         | Difícil control de enzimas; RNA protegido en cápsides parcialmente dañadas puede seguir detectándose | Protocolo secuencial (2 pasos) mejora resultados frente al protocolo en un solo paso                 |
| <b>Unión con ligandos + RT-qPCR</b>                      | Captura selectiva de partículas intactas usando HBGA, PGM, anticuerpos o aptámeros | Rápido, sensible, concentra virus, remueve inhibidores; adaptable a matrices alimentarias | La especificidad depende del ligando; no elimina virus con genoma mutado, pero cápside funcional     | El aptámero M6-2 mostró comportamiento similar a HBGA; resultados variables según cepa y tratamiento |

## 2.6 Otros métodos de detección.

### 2.6.1 Métodos isotérmicos.

Las técnicas de amplificación isotérmica representan un avance importante en la detección molecular de patógenos, ya que permiten la amplificación del material genético a temperatura constante, eliminando la necesidad de equipos térmicos complejos como los termocicladores. Estas metodologías son particularmente útiles para aplicaciones en campo o en lugares con recursos limitados, debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo. Entre las principales técnicas isotérmicas aplicadas para la detección tanto de norovirus como del virus de hepatitis A se encuentran la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, del inglés Loop-Mediated Isothermal Amplification), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y amplificación por polimerasa con recombinasa (RPA, del inglés Recombinase Polymerase Amplification).

LAMP ha demostrado ser eficaz para identificar diversos subtipos de norovirus humano, con un límite de detección cercano a 1,000 copias genómicas por reacción, sin presentar

reactividad cruzada entre subtipos, adicionalmente y para facilitar la interpretación, se ha incorporado el colorante azul de naftol hidroxilo en RT-LAMP, manteniendo una sensibilidad similar y obteniendo una alta concordancia con la RT-qPCR convencional (Fukuda et al., 2006; Luo et al., 2014). Más recientemente, se desarrolló una versión de RT-LAMP de un solo paso que superó en sensibilidad por un factor de diez a la RT-qPCR estándar. Gracias a su bajo costo, alta sensibilidad y facilidad de uso, esta técnica es ideal para la detección rápida directamente en campo, y su formato múltiple ofrece un potencial adicional para aplicaciones más complejas (Jeon et al., 2017).

Por otro lado, la tecnología NASBA también se ha utilizado para la detección de norovirus, permitiendo identificar ARN viral en muestras fecales con un tiempo de análisis entre 4 y 6 horas. Varios estudios han reportado sensibilidades del 100% y especificidades cercanas al 80%, mostrando una buena concordancia con métodos estándar como la RT-qPCR (Greene et al., 2003). La NASBA destaca por no requerir muestras de alta calidad, su facilidad de manejo y alta precisión, lo que la convierte en una herramienta valiosa para diagnósticos rápidos y vigilancia temprana de infecciones.

Finalmente, la RT-RPA emerge como una técnica innovadora que permite detectar norovirus humano en menos de 30 minutos a temperatura constante (40 °C), con un límite de detección alrededor de 2,500 copias genómicas (3.4 log) (Moore & Jaykus, 2017). Este método es menos susceptible a inhibidores presentes en muestras complejas y ofrece un procedimiento ágil que facilita la identificación rápida del agente infeccioso, ayudando a frenar la propagación del virus.

### *2.6.2 Biosensores.*

En años recientes, los biosensores han emergido como una herramienta prometedora para la detección de patógenos, destacando por su rapidez, estabilidad, bajo costo y la posibilidad de ser integrados en dispositivos portátiles para diagnóstico directo en el punto de atención. Un biosensor típicamente consta de tres componentes principales: un elemento de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema de procesamiento de señales (Vo-Dinh & Cullum, 2000). La interacción específica entre el analito y el elemento biológico se transforma en una señal medible a través del transductor, permitiendo la detección precisa. La elección del elemento biológico es fundamental para

la especificidad del biosensor y debe ser altamente afin a la sustancia objetivo, además de ser estable. Estos elementos pueden incluir enzimas, anticuerpos, ligandos, ácidos nucleicos, fagos y polímeros moleculares, entre otros, siendo los anticuerpos los más utilizados para la detección viral. Según el mecanismo de transducción, los biosensores se clasifican en electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos (Justino et al., 2015; Saylan et al., 2019). Actualmente, el desarrollo de biosensores enfocados en la detección de norovirus humano ha recibido considerable atención, con esfuerzos dirigidos a crear dispositivos que sean rápidos, sensibles, portátiles y de fácil manejo para su aplicación en alimentos, ambientes y muestras clínicas (Adegoke et al., 2016; Ashiba et al., 2017; Baek et al., 2019; Hwang et al., 2017).

## *2.7 Detección basada en CRISPR.*

La reacción de PCR es el método más utilizado para detectar ácidos nucleicos específicos. Sin embargo, esta técnica requiere equipos especializados y costosos, así como personal capacitado. Recientemente se han desarrollado métodos innovadores para detectar ácidos nucleicos utilizando la tecnología de edición de genes CRISPR. Los sistemas inmunitarios adaptativos de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas en clústeres microbianos (CRISPR) y asociados a CRISPR (CRISPR-Cas) contienen endonucleasas programables que pueden aprovecharse para el diagnóstico basado en la técnica CRISPR (CRISPR-Dx, Gronowski, 2018). Mientras que algunas enzimas Cas se dirigen al ADN, las ARNasas guiadas por ARN de efector único, como Cas13a (anteriormente conocida como C2c2), se puede reprogramar con ARN CRISPR (ARNcr) para proporcionar una plataforma para la detección de ARN específico. Tras el reconocimiento de su ARN objetivo, Cas13a activado se involucra en la escisión "colateral" de los ARN cercanos no específicos. Esta actividad de escisión colateral programada por crARN permite a Cas13a detectar la presencia del ARN buscado *in vivo* o *in vitro* mediante la degradación inespecífica del ARN marcado con una molécula reportera (Gootenberg et al., 2017; Gronowski, 2018; Petri & Pattanayak, 2018).

### 2.7.1 CRISPR SHERLOCK.

En 2017, un grupo de científicos informó sobre el desarrollo de una tecnología llamada SHERLOCK. Su objetivo era desarrollar un método para detectar rápidamente ácidos nucleicos con alta sensibilidad, y especificidad de base única en una plataforma portátil. En lugar de usar la endonucleasa Cas9, la técnica SHERLOCK usa una proteína relacionada, pero diferente, la Cas13a, que se une y escinde el ARN en lugar de los sustratos de ADN. Después de que Cas13a escinde su ARN objetivo, adopta un estado enzimáticamente "activo" en lugar de volver a un estado inactivo, como Cas9. Luego, Cas13a se une y escinde ARN adicionales independientemente de la homología, proceso conocido como "escisión colateral". Es esta propiedad de Cas13a la que abre la posibilidad de utilizar Cas13a como herramienta de diagnóstico (Abudayyeh et al., 2017; Gootenberg et al., 2017; Myhrvold et al., 2018).

La técnica SHERLOCK funciona amplificando el ARN (o ADN con una transcriptasa inversa) mediante amplificación por la polimerasa recombinasa, en un proceso isotérmico de ácido nucleico. Esta amplificación isotérmica no requiere instrumentación especializada, ya que utiliza una sola temperatura. Los nucleótidos amplificados se combinan con la nucleasa Cas13a, un ARN guía que coincide con la secuencia de ácido nucleico de interés y una secuencia de nucleótidos corta que se acopla a un indicador fluorescente y un atenuador. Si la secuencia diana está presente en el conjunto de nucleótidos amplificados, la actividad ARNasa no específica de Cas13a se activa y el indicador de ARN se escindirá dando como resultado la activación del fluoróforo. Por lo tanto, la señal fluorescente se usa como indicador para determinar si la secuencia diana está presente en el grupo original de nucleótidos (Abudayyeh et al., 2017; Gootenberg et al., 2017; Gronowski, 2018; Myhrvold et al., 2018; Petri & Pattanayak, 2018).

Se ha demostrado que la técnica SHERLOCK es capaz de distinguir entre el virus del Zika (ZIKV) y el virus del dengue (DENV) en aislamientos clínicos (suero u orina) incluso a concentraciones tan bajas como 2,000 copias/ml (3.2 aM). También pudieron distinguir entre varias cepas bacterianas patógenas, genotipificar el ADN humano e identificar mutaciones en el ADN tumoral libre de células y las aplicaciones diagnósticas siguen aumentando (Gootenberg et al., 2017).

Se han desarrollado avances en la tecnología SHERLOCKv2 (Gootenberg et al., 2018): multiplexación de cuatro canales, medición cuantitativa tan baja como 2 aM, aumento de 3.5 veces en la sensibilidad de la señal, y desarrollo de una lectura de flujo lateral. La flexibilidad de esta nueva tecnología revolucionaria tiene un potencial enorme, los usos propuestos han incluido la detección rápida de patógenos de neumonía tanto virales como bacterianos en un mismo ensayo, monitoreo de la carga viral en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que reciben terapia en áreas de recursos limitados, biopsia líquida para detectar mutaciones en el ADN libre de células, resultados rápidos de tuberculosis antes de que el paciente se pierda durante el seguimiento e incluso la detección rápida de genes de resistencia a patógenos (Gootenberg et al., 2018; Kellner et al., 2019; Mustafa & Makhawi, 2021).

#### 2.7.2 Detección basada en CRISPR en alimentos.

CRISPR Cas13a también se ha aplicado para detectar el virus de la influenza aviar A (H7N9, Ackerman et al., 2020; Gootenberg et al., 2018), virus del Ébola (Barnes et al., 2020), de Epstein-Barr, del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, de la peste porcina africana, y agentes bacterianos como *Salmonella* Enteritidis, micro ARN's, genes vegetales (Gronowski, 2018; Zhou et al., 2020), metilación de bases y proteínas y más recientemente en la detección del virus SARS-CoV2 (Arizti-Sanz et al., 2020). Sin embargo, la detección de agentes virales en alimentos ha sido poco explorada.

Zhou et al., (2020), desarrollaron una plataforma de detección de bacterias basada en CRISPR Cas13a, particularmente para *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos. Reportaron que el método fue capaz de detectar ADN genómico a concentraciones tan bajas como 100 aM, con un límite de detección de 1 UFC/ml en un rango de 100 a 10<sup>7</sup> UFC/ml. El tiempo del ensayo completo fue de menos de 4 h y demostró una selectividad satisfactoria para *S. aureus* sin interferencia de otras bacterias en alimentos como leche, jugo, cerveza y agua, mostrando un rendimiento comparable al método de recuento convencional basado en cultivos, pero con un tiempo de ensayo corto y de alta sensibilidad.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

El norovirus humano y el virus de la hepatitis A son los principales virus responsables de enfermedades transmitidas por alimentos, con una participación estimada en más del 20% de los brotes alimentarios en todo el mundo. Las técnicas basadas en RT-qPCR son ampliamente utilizadas para la detección de estos virus, sin embargo, presentan limitaciones importantes, como la incapacidad de distinguir entre virus infecciosos y no infecciosos, así como su dependencia de equipos costosos y largos tiempos de procesamiento. Esto puede derivar en falsos positivos que sobreestiman el riesgo a una infección real. Diversos enfoques de pretratamiento han sido propuestos para mejorar la correlación entre la detección molecular y la infectividad, entre ellos el uso de enzimas como la ARNasa, capaz de degradar ARN viral expuesto de partículas con cápsides dañadas, lo cual permite reducir la detección de virus no infecciosos. Recientemente se ha desarrollado una plataforma de detección molecular basada en el sistema CRISPR, la cual combina la pre-amplificación de ácidos nucleicos con enzimas Cas para el reconocimiento específico de secuencias objetivo de ADN o ARN. Esta tecnología permite una detección ultrasensible, específica y potencialmente portátil de ácidos nucleicos, lo que la hace especialmente atractiva para su implementación en escenarios de detección rápida. No obstante, su aplicación en el ámbito de la inocuidad alimentaria representa un área de gran potencial, aunque aún poco explorada. El análisis de muestras alimentarias plantea retos técnicos significativos, particularmente en la detección de virus, debido a la complejidad de las matrices y a las bajas concentraciones de los agentes virales.

La incorporación de este tipo de pretratamientos en plataformas CRISPR podría aumentar la especificidad funcional del ensayo, permitiendo una aproximación más precisa al riesgo real de infección. Por tanto, el desarrollo de un método de detección basado en la plataforma CRISPR, combinado con pretratamientos enzimáticos como ARNasa, representa una estrategia prometedora, económica y de rápida implementación para la detección diferenciada de virus infecciosos en alimentos. Esta herramienta tendría un impacto directo en la mejora de los tiempos de respuesta ante brotes alimentarios, así como en el fortalecimiento de los sistemas de monitoreo y control sanitario en la cadena de producción alimentaria.

#### **4. HIPÓTESIS.**

El método de detección basado en CRISPR Cas13a acoplado a ARNasa es capaz de detectar y/o cuantificar norovirus y el virus de hepatitis A potencialmente infecciosos en muestras de alimentos de una manera igual o mejor que la técnica actual basada en RT-qPCR.

## **5. OBJETIVO GENERAL.**

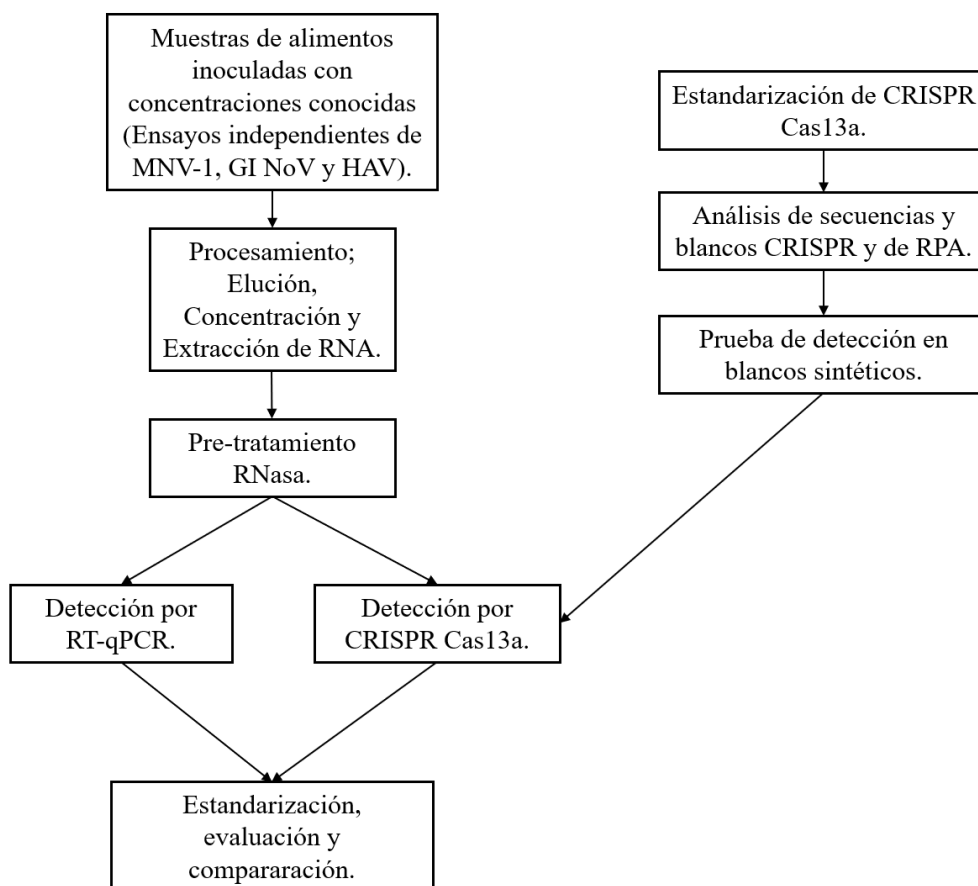
Determinar la eficiencia, sensibilidad y especificidad de un método basado en CRISPR Cas13 acoplado a ARNasa para la de detección de norovirus y virus de hepatitis A, en comparación con el método basado en RT-qPCR.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Crear secuencias aptas para la detección de norovirus y virus de hepatitis A por CRISPR Cas13a y amplificación de ácidos nucleicos por amplificación isotérmica por recombinasa-polimerasa.
- Estandarizar la técnica de detección CRISPR Cas13a para detección de norovirus y virus de hepatitis A a partir de muestras de alimentos.
- Establecer límites de detección y especificidad del método CRISPR Cas13a.
- Comparar la sensibilidad y especificidad del método CRISPR Cas13a para detección de norovirus y virus de hepatitis A con el método basado en RT-qPCR.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

### Esquema general.



### 6.1 Líneas celulares.

Las líneas RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) y FRhK-4 (ATCC® CRL-1688™) se cultivaron y mantuvieron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich St. Louis, MO). Ambas líneas fueron suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma -Aldrich St. Louis, MO). Las células se cultivaron según los protocolos de cultivo de células estándar y se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.2 Virus

El norovirus murino (MNV-1, Murine norovirus 1 ATCC® VR-1937™), se utilizó como virus subrogado de NoV humano y para estandarización. MNV-1 se propagó en células

RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) y el VHA (ATCC® VR-1402™) en células FRhK-4 (ATCC® CRL-1688™). Para la propagación; las células se sembraron en cajas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> hasta formar una monocapa de aproximadamente 80-90 % de confluencia. Antes de la infección, se retiró el medio y se añadió una alícuota viral previamente titulada por RT-qPCR y ajustada por dilución (M.O.I 0.1-10) en medio sin SFB. La caja de cultivo se incubó durante 1 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después, se añadieron 10 ml de medio suplementado con SFB al 2%. Se incubó durante 4 a 6 días, hasta observar el efecto citopático inducido por virus (redondeo de células, pérdida de adhesión y muerte celular) en el 90% de las células. El virus recuperado se almacenó a -80°C por 24 h. Después, la alícuota viral se descongeló a temperatura ambiente y se realizó un ciclo de congelación-descongelación adicional, se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min para eliminar todos los restos celulares. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y la alícuota viral se dividió en tubos de microcentrífuga de 0.6 ml. Las alícuotas virales se almacenaron a -80°C. Las titulaciones virales se realizaron siguiendo el protocolo de RT-qPCR. Para el norovirus humano se utilizó una muestra de heces humanas previamente confirmada por RT-qPCR y secuenciación correspondiente a norovirus humano GI.5[P4].

### *6.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.*

La extracción de ARN se realizó mediante el protocolo de extracción de ARN viral QIAamp (QIAGEN), siguiendo la metodología descrita por el proveedor. La extracción en todas las variables fue realizada con 140 µl de muestra y cada elución de ARN fue realizada en 60 µl. En el caso de la transcripción inversa (ADNc) se utilizó el kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit llevando a cabo las instrucciones del proveedor a un volumen final de 20 µl. Las condiciones de síntesis de ADNc fueron 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C en un termociclador punto final Veriti™ 96-Well thermal Cyclor (Applied Biosystems™).

### *6.4 Cuantificación por RT-qPCR.*

Se realizaron diluciones seriadas de ADN conteniendo cada blanco viral a partir de una concentración conocida (~ 1,000,000 a 1 copias genómicas /reacción) de un gBlock™ sintético (IDT, USA), esto para la generación de curvas estándar para la cuantificación.

Se realizaron las rondas de amplificación en el termociclador PikoReal 96, Thermo Scientific con los protocolos respectivos a cada blanco: MNV-1; 95 °C durante 900 s (15 min) y 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 20 s y 62 °C durante 60 s con óptica encendida. HAV; 95 °C durante 900 s (15 min) y 50 ciclos de 95 °C durante 10 s, 53 °C durante 25 s, 64 °C durante 70 s con óptica encendida. Norovirus GI; 95 °C durante 900 s (15 min) y 50 ciclos de 95 °C durante 10 s, 53 °C durante 25 s y 62 °C durante 70 s con óptica encendida. La qPCR se realizó utilizando el kit SensiFAST™ Probe No-ROX (Meridian Bioscience®, OH, EE. UU.) con el volumen y la concentración finales recomendados por el fabricante. Se utilizaron 3 µl de ARN viral extraído por reacción. Para la cuantificación absoluta y el límite de cuantificación (LOQ) de la RT-qPCR, se construyó una curva estándar (**Figura 6**). Cada curva estándar contiene diez diluciones decimales ( $5.06 \times 10^9$  a  $5.06 \text{ gc/rx}$ ), y cada dilución tenía tres réplicas. La curva se construyó utilizando un producto de amplificación de MNV-1 purificado a partir de un gel de agarosa con el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega® WI, EE. UU.). Una vez purificado, se utilizó espectrofotometría con el NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) para calcular la concentración de ADN (ng/µl). El LOQ se estableció en la concentración más baja donde todas las réplicas amplificaron con un  $C_q < 40$ . Para convertir la concentración de ADN espectrofotométrica (ng/µl) en número de copias, se utilizó la siguiente fórmula:  $\text{número de copias} = (\text{concentración en ng/µl} \times 10^9) / (\text{Peso molecular del ADN en g/mol} \times \text{número de Avogadro})$ . Para determinar el límite de cuantificación (LOQ) para el ensayo RT-qPCR dirigido al norovirus murino (MNV-1), se analizó la curva estándar de dilución seriada de diez puntos y 10 veces del estándar de ARN cuantificado ( $5.06 \times 10^9$  a 15 copias genómicas por reacción) en tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas técnicas ( $n = 9$  por dilución). El LOQ se definió en función de la precisión y la exactitud, siguiendo las directrices establecidas (Forootan et al., 2017; Taylor, 1987). La precisión se evaluó utilizando el coeficiente de variación (CV):  $\text{CV (\%)} = (\text{Desviación estándar del número de copias} / \text{Número medio de copias}) \times 100$ . Se utilizó un umbral de CV de  $\leq 35\%$  (Klymus et al., 2020). La precisión se evaluó mediante el error relativo absoluto (ARE):  $\text{ARE (\%)} = |(\text{Número de copias medido} - \text{Número de copias de entrada}) / \text{Número de copias de entrada}| \times 100$ . En ausencia de criterios estandarizados específicos para qPCR, se adoptó un umbral de  $\text{ARE} \leq 20\%$  según

la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA de EE. UU. (FDA, 2018). Con base en los criterios definidos ( $CV \leq 35\%$ ,  $ARE \leq 20\%$ ), el límite de cuantificación (LOQ) para el ensayo RT-qPCR de MNV-1 se determinó en 5 gc/rx ( $CV = 19.7\%$ ,  $ARE = 3,3\%$ ). En los ensayos realizados en matrices de lechuga y mora azul, no se pudo establecer el LOQ debido a valores excesivos de ARE (lechuga  $> 50\%$ , mora azul  $> 97\%$ ), probablemente debido a una baja eficiencia de recuperación viral (**Tablas 5 y 6**). En consecuencia, para estas matrices, se calculó el límite de detección (LOD)..

### 6.5 *Diseño de primers RPA y crARN.*

Todos los primers y ARNcr se diseñaron dentro de la misma región. Todas las secuencias disponibles de la cepa CW1 de MNV-1 en GenBank se alinearon utilizando Clustal Omega (Sievers et al., 2011). El genoma completo secuenciado de ATCC® VR-1937™ se utilizó como la cepa principal CW1 de MNV-1 y se determinó una región conservada mediante un alineamiento múltiple (Clustal Omega). La región conjunta codificante de poliproteína de la ARN polimerasa dependiente de ARN y la proteína de la cápside se eligieron objetivo de qPCR y CRISPR (ORF1 y ORF2). Los primers y la sonda de qPCR se diseñaron utilizando NCBI-Primer-BLAST y la herramienta IDT-PrimerQuest™, junto con herramientas de análisis de calidad (Integrated DNA Technologies IDT-OligoAnalyzer™ y Primer3). Los primers de amplificación de polimerasa de recombinasa isotérmica (RPA) se diseñaron siguiendo el manual de diseño de ensayos TwistAmp® (TwistDx™, Cambridge, Inglaterra). Además, se agregó un promotor T7 al extremo 5' del primer forward RPA para una transcripción del ARN. El ARNcr para MNV-1 se diseñó siguiendo las pautas publicadas a partir de la detección basada en Cas13a original desarrollada (Kellner et al., 2019) y se obtuvo de Integrated DNA Technologies IDT (IA, EE. UU.). Este enfoque fue utilizado solo para el diseño del blanco de MNV-1 para la estandarización e implementación de la detección por Cas13a, sin embargo, en el tiempo de realización no existían herramientas particulares para este enfoque hasta el año 2022, donde un modelo de machine learning “*Activity-informed Design with All-inclusive Patrolling of Targets, ADAPT*” (<https://adapt.run/>) fue desarrollado para predecir la actividad enzimática de Cas13a al detectar un objetivo viral, que corresponde a su sensibilidad, utilizando un enfoque basado en mediciones. Esta herramienta genera un

conjunto de datos de lectura de fluorescencia durante las reacciones de detección. Realiza un diseño automatizado para diagnóstico de especies virales que infectan vertebrados. Los diseños de ADAPT son sensibles y específicos al nivel de linaje y permiten límites de detección más bajos, a lo largo de la variación de un virus, que los resultados de las técnicas de diseño estándar. En el caso de VHA, el diseño fue alimentado con un “input” de secuencia original, el genoma completo de la cepa y virus VHA (ATCC® VR-1402™), correspondiente al GenBank Accession No. KP879216.1. Para norovirus GI, dos estrategias fueron utilizadas. Para asegurar una detección eficiente de nuestro aislado viral GI.5[P4] se alimentó el modelo con la secuencia correspondiente al amplicón secuenciado de 523 pb de la región conjunta de la polimerasa RdRp y cápside. Adicionalmente se diseñó una secuencia en base a un alineamiento múltiple de los 9 genotipos pertenecientes a norovirus GI, GI.1-9. Se utilizó una región conservada en el sitio conjunto RdRp/cápside para su evaluación como proto-spacer en el ARNcr. Las secuencias de HAV y norovirus GI fueron diseñadas por este medio y sometidas a un análisis de calidad manual como fue descrito previamente para MNV-1. Todas las secuencias utilizadas en este trabajo se resumen en la **tabla 4**.

#### *6.6 Amplificación isotérmica de la polimerasa recombinasa (RPA).*

Utilizando las instrucciones del proveedor del kit Basic TwistAmp™ (TwistDx™, Cambridge, Inglaterra), donde en un volumen final de 50 µl, se añadieron 10 µM de cada primer, más 29.5 µl de tampón de rehidratación sin primers, 5 µl de ARN viral extraído y, como iniciador de la reacción, 280 mM de acetato de magnesio (MgOAc). Las muestras se incubaron a 39°C durante 20 min y el producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa.

#### *6.7 Detección Cas13a (Un solo paso).*

La detección por CRISPR Cas13a consistió en la combinación de la amplificación de RPA, la transcripción de T7 y el sistema Cas13a en una sola reacción. Se utilizó un volumen de reacción de 50 µl con los siguientes reactivos y concentraciones: volumen de mezcla RPA que contenía 20 µl de tampón de reacción 2x, 5 µl de 10x Basic E-mix (TwistAmp® Liquid Basic), 2.4 µl de cebador directo (10 µM) y 2.4 µl de cebador inverso

(10  $\mu$ M, (secuencias de cebador RPA en la **Tabla 4**), 2  $\mu$ l de dNTP totales de 1.8 mM (Thermo Scientific™, MA, EE. UU.), 2.5  $\mu$ l de 20x Core Reaction Mix, 0.25  $\mu$ l de Cas13a (10  $\mu$ M) (SignalChem Biotech, Richmond, Canadá), 0.125  $\mu$ l de crRNA (10  $\mu$ M), 1.5  $\mu$ l de ARN polimerasa T7 (50 U/ $\mu$ l; Thermo Scientific™, MA, EE. UU.), 2  $\mu$ l de mezcla de ribonucleósido trifosfato (rNTP) (50 mM; Thermo Scientific™, MA, EE. UU.), 2  $\mu$ l de inhibidor de ARNasa (40 U/ $\mu$ l; Promega© WI, EE. UU.), 0.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (500 mM; Promega© WI, EE. UU.), 1  $\mu$ l del kit de análisis de laboratorio RNaseAlert™ v2 (1  $\mu$ M; Invitrogen™, MA, EE. UU.) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. A continuación, se añadieron 3  $\mu$ l de plantilla y 2.5  $\mu$ l de acetato de magnesio (280 mM) al tapón del tubo y este se cerró. Esta mezcla se agitó en vórtex y se centrifugó para iniciar la reacción. Las muestras se subdividieron en réplicas de 25  $\mu$ l (considerando al menos dos reacciones). La intensidad de fluorescencia se midió cada minuto en el sistema de PCR en tiempo real PikoReal™ (Thermo Scientific™, MA, EE. UU.). Se tomaron mediciones de fluorescencia a los 120 minutos para capturar la fase lineal de la reacción, antes de la estabilización. En este punto, la concentración más baja analizada mostró una señal de fluorescencia significativamente mayor que la del control sin molde, lo que confirmó la detección positiva sin la influencia de la saturación de la señal. Dado que el ensayo CRISPR, a diferencia de la RT-qPCR, no puede proporcionar una cuantificación absoluta de las muestras, en lugar de un límite de cuantificación (LOQ), se calculó el límite de detección (LOD). Para el límite de detección (LOD) de CRISPR, el producto MNV-1 utilizado para el LOQ de la RT-qPCR. (descrito anteriormente) se utilizó para el LD. Este se fijó en la dilución más baja (utilizando las mismas diluciones que con la RT-qPCR) donde todas las réplicas superaron el umbral de positividad para CRISPR (fluorescencia media de los controles negativos más tres veces su desviación estándar).

#### *6.8 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la detección mediante CRISPR.*

Para evaluar la sensibilidad de detección de nuestro método integrado, se utilizaron seis diluciones seriadas de diez veces que iban desde  $5.06 \times 10^5$  a 5.06 gc/rx de MNV-1 para determinar el límite de detección (LOD, detección mediante CRISPR) y el límite de cuantificación (LOQ, RT-qPCR). Para evaluar la especificidad de nuestro método integrado de ADN, la amplificación del ARN de MNV-1 se comparó con la amplificación

de otros ADN diana distintos de MNV-1, incluidos el virus de la hepatitis A (VHA), los genogrupos GI y II del norovirus humano y el rotavirus. La diana de VHA fue la región 5'-UTR para todas las cepas del VHA. Los dianas del genogrupo GI y GII del norovirus humano fueron los descritos en el Capítulo 26 de la FDA BAM (Williams-Woods et al., 2022). Los blancos de HAV y norovirus se generaron utilizando fragmentos de genes gBlocks (IDT, EE. UU.). El objetivo de rotavirus fue la región VP6 de rotavirus de la cepa A utilizando el plásmido pT7-VP6SA11, un obsequio de Takeshi Kobayashi (plásmido Addgene n.º 89166; <http://n2t.net/addgene:89166>; RRID:Addgene\_89166).

### 6.9 Muestras e inoculación.

Se compraron lechugas frescas tipo iceberg (*Lactuca sativa* var. capitata) y moras azules comunes norteamericanos (*Vaccinium corymbosum*) en tiendas de alimentos locales en el norte de México. Estas matrices alimentarias se seleccionaron como frutas representativas (p. ej., bayas) y verduras (p. ej., verduras de hoja verde) asociadas con brotes de norovirus y VHA. Ambas matrices se subdividieron de forma independiente en muestras de 25 g y se colocaron en bolsas Whirl-Pak® (VWR™, WI, EE. UU.). Se eliminó cualquier suciedad adherida frotando suavemente. Se inocularon en muestras de 25 g de producto replicadas seis dosis diluidas diez veces ( $5.06 \times 10^5$  a  $5.06$  copias genómicas/reacción [gc/rx] en 300 µl de PBS) de inóculo viral ( $5.06 \times 10^9$  gc/rx) y se dejaron secar al aire durante 1 hora. Para ambas matrices alimentarias, se incluyó un inóculo de 300 µl de PBS sin virus como control negativo. Para cada matriz alimentaria y cada dilución, se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno.

### 6.10 Elución y concentración del virus.

Para la elución y concentración de cada muestra de alimento, se siguió la norma ISO 15216-1:2017 (ISO, 2017). Brevemente, se añadieron 40 ml de tampón Tris (1 mol/l), glicina 0.5 M y extracto de carne de vacuno al 1 % (TGBE) a cada muestra. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante durante 20 min. El pH de las muestras se controló cada 10 min y, si era necesario, se ajustó a  $9.5 \pm 0.5$  con NaOH 10 N. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml y se clarificó por centrifugación a  $10,000 \times g$  durante 30 min a 5 °C. El sobrenadante se recogió y se ajustó a un pH de 7.0.

Se añadieron 0.25 volúmenes de solución 5x polietilenglicol (PEG)/NaCl (500 g/l PEG 8000 (Sigma-Aldrich, EE. UU., 1.5 mol/l NaCl) al sobrenadante recuperado y se homogeneizaron mediante agitación durante 60 s y se incubaron con balanceo constante (aproximadamente 60 oscilaciones min<sup>-1</sup>) a 5 °C durante 60 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 g durante 30 min a 5 °C, se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500 µl de PBS. Las muestras se subdividieron para el pretratamiento adicional con ARNasa.

#### *6.11 Pretratamiento con ARNasa.*

Antes de la extracción de ARN, el virus eluido (500 µl de PBS) se dividió en una muestra de 100 µl que se descartó, una muestra de control sin ARNasa de 200 µl y una muestra tratada con ARNasa de 200 µl. La muestra tratada con ARNasa de 200 µl se incubó con 1 µl de 10 U de ribonucleasa RNase ONE™ (Promega, WI, EE. UU.) y 99 µl de tampón de reacción 1X (volumen total de reacción de 300 µl) durante 30 min a 37 °C en el termociclador, utilizado como bloque de temperatura constante. La reacción se detuvo añadiendo tampón de lisis antes de la extracción de ARN. También se incluyó un control tratado térmicamente, en el que MNV-1 se calentó a 80 °C durante 5 min antes del tratamiento con ARNasa. Para cada amplificación también se incluyeron controles de amplificación negativos (agua) y positivos (11.59 log 10 gc de MNV-1/25 g de alimento).

#### *6.12 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la detección CRISPR.*

Para evaluar la sensibilidad de detección de nuestro método integrado, se utilizaron seis diluciones seriadas de MNV-1, con valores de 5.06 x 10<sup>6</sup> a 5.06 gc/rx, para comparar el límite de detección (LOD, CRISPR) y el límite de cuantificación (LOQ, RT-qPCR). Para evaluar la especificidad de nuestro método, se comparó la amplificación del ARN de MNV-1 con la de otras dianas de ARN distintas de MNV-1, como el virus de la hepatitis A (VHA), los genogrupos GI y II del norovirus humano y el rotavirus. Como se describe en el Capítulo 26 de la FDA BAM (Williams-Woods et al., 2022), la diana del VHA fue la región 5'-UTR para todas las cepas del VHA (448-537 nt, 89 pb, acceso M14707 en GenBank). La diana del norovirus humano fue la región de la ARN polimerasa (ORF1) para GI (5287-5371 nt, 84 pb, acceso KF039728 en GenBank) y GII (5003-5100, 97 pb,

acceso EF684915 en GenBank). Tanto las dianas de norovirus como las de VHA se generaron utilizando fragmentos génicos gBlocks (IDT, EE. UU.). El objetivo del rotavirus fue la región VP6 del rotavirus (24-1217 nt, 1193 pb, basado en el número de acceso GenBank NC\_011509.2) de la cepa A del rotavirus utilizando el plásmido pT7-VP6SA11, un obsequio de Takeshi Kobayashi (plásmido Addgene n.º 89166; <http://n2t.net/addgene:89166>; RRID:Addgene\_89166).

### *6.13 Eficiencia de recuperación.*

Para el método RT-qPCR, la eficiencia de recuperación de los pasos de elución y concentración se estimó utilizando la ecuación: Rendimientos de recuperación del virus (%) =  $10 (\Delta Cq/m) \times 100\%$  donde  $\Delta Cq$  es el valor de  $Cq$  del ARN viral extraído de la muestra de alimento menos el valor de  $Cq$  del ARN viral extraído de la dosis de dilución del inóculo de MNV, y  $m$  es la pendiente de la curva estándar de transcripción del ARN del virus (ISO, 2017). Para el método CRISPR, como hasta la fecha no existe un método de eficiencia de recuperación publicado, adaptamos un método de eficiencia de recuperación de ensayos de detección de alimentos virales (H. Park et al., 2010). La eficiencia de recuperación de los pasos de elución y concentración se estimó utilizando la ecuación: Rendimientos de recuperación del virus (%) = (valor medio de fluorescencia del ARN viral extraído de la muestra de alimento / valor medio de fluorescencia del ARN viral extraído de la dosis de dilución del inóculo de MNV)  $\times 100\%$ . Los datos de fluorescencia media utilizados, para las tres réplicas de cada dosis, se obtuvieron al final de la reacción CRISPR (120 min). Debido a las diferencias inherentes en los principios y unidades de medición entre los métodos de detección RT-qPCR y CRISPR, los datos de recuperación se presentan de forma descriptiva y no se comparan directamente.

### *6.14 Análisis estadístico.*

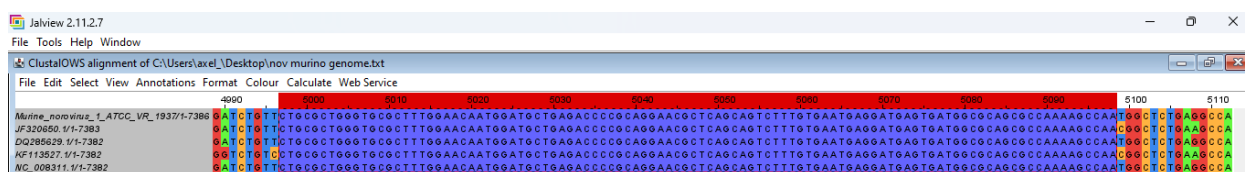
En todos los ensayos se realizaron tres repeticiones con tres réplicas cada uno. El umbral de positividad para CRISPR se definió como la fluorescencia media de los controles negativos más tres veces su desviación estándar (media +  $3 \times DE$ ). Las diferencias estadísticas entre los controles negativos y las muestras se determinaron mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Las

diferencias significativas en los valores del ensayo entre muestras tratadas térmicamente y no tratadas térmicamente, o entre muestras tratadas con ARNasa y no tratadas, se analizaron mediante un modelo de regresión lineal utilizando el valor del ensayo (RT-qPCR, título viral transformado en  $\log_{10}$ ; CRISPR, fluorescencia con sustracción de fondo) como resultado y la dosis (transformada en  $\log_{10}$ ), el tratamiento (exposición de interés), las réplicas y los experimentos independientes (ajuste) como exposiciones. La normalidad de la distribución de los datos se confirmó antes del análisis. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando paquetes estadísticos en lenguaje de programación R (R Studio).

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Diseño de secuencias.

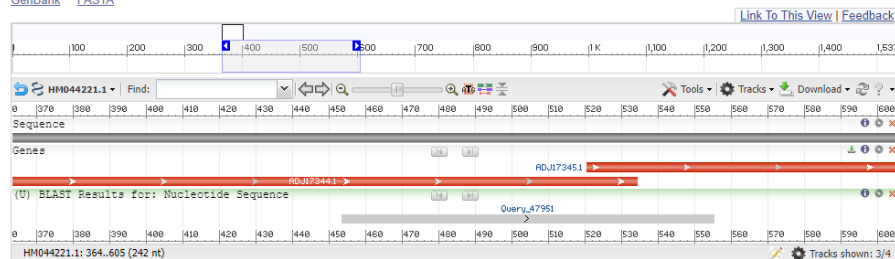
Se seleccionaron secuencias de MNV-1 para encontrar una región conservada para la detección de Cas13a. Se identificó una región conservada (posición del genoma 364-605) con base en una alineación múltiple de cinco secuencias de MMV-1 CW1 disponibles ejecutadas por Clustal Omega. La región seleccionada incluía la unión entre la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y el gen de la proteína de la cápside (**Figura 1 y 2**).



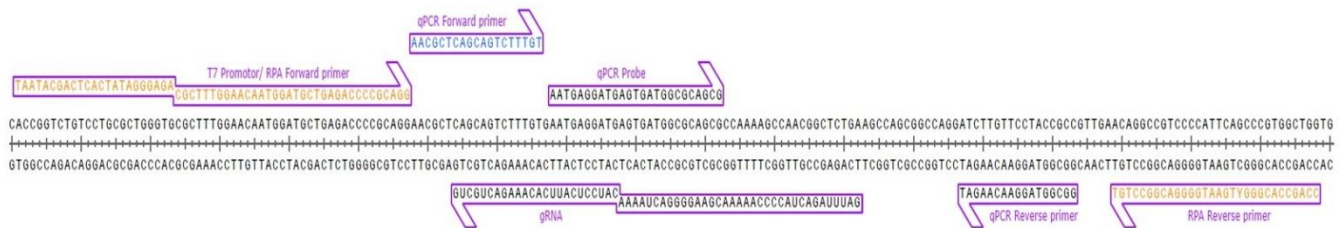
#### Murine norovirus 1 clone Rec1 MNV-1 WU20/CW1 RNA-dependent RNA polymerase and capsid protein genes, partial cds

GenBank: HM044221.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



**Figura 1.** Proceso de obtención de secuencias conservadas de MNV-1 para el diseño de primers de qPCR y región RPA/ CRISPR-Cas13a.



**Figura 2.** Esquema de ADN de los primers y el diseño del ARNcr. Se indican el objetivo RdRp/Capside de MNV-1, los primers RPA, los primers qPCR y el ARNcr. El primer forward de RPA contiene el promotor T7. El ARNcr está diseñado para dirigirse al ARN blanco sintetizado a partir de la secuencia 5' de DNA.

En el caso de las secuencias de VHA, se utilizó el modelo ADAPT para generar las secuencias a partir del genoma completo de referencia y se seleccionaron aquellas con mejor score de actividad enzimática (**Figura 3**).

ADAPT

ASSAY OPTIONS

Assays made for RPA primers and LwaCas13a crRNAs  
Positions based on a multiple sequence alignment of available genomes

HAV

| RANK | AMPLICON                 | PRIMER SEQUENCES                                                                             | SPACER SEQUENCES                    |                                                          |
|------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 1    | Start: 2386<br>End: 2474 | Forward: 5'-AGACATTTCTCTGAATTGAACTGGAGAAT-3'<br>Reverse: 5'-AAGAAATGAGACCTTCCCATAACTTGTAG-3' | 5'-AUGGACAUUAUGAUCUGAUGUAUGUCUGG-3' | <a href="#">DETAILS</a><br><a href="#">VISUALIZATION</a> |
| 2    | Start: 6722<br>End: 6810 | Forward: 5'-TGAAGTATCTGGAAGTCCATCCCATTTTGG-3'<br>Reverse: 5'-GTAACAACAGTTATACAGCAATGCTTGG-3' | 5'-AUAAGUAUGAUGUAUUGAUAAGAGCUGUG-3' | <a href="#">DETAILS</a><br><a href="#">VISUALIZATION</a> |
| 3    | Start: 1552<br>End: 1640 | Forward: 5'-AAGATTGGAAATCTGATCGTCCAGGGTG-3'<br>Reverse: 5'-TGAGCAGCCAAAGTTGGAATAGATGTCCAA-3' | 5'-GUAGUAAAUGAGUAAUUUGAUCCAC-3'     | <a href="#">DETAILS</a><br><a href="#">VISUALIZATION</a> |
|      | Start: 2285              | Forward: 5'-AGGAAAAGCTAACAGAGGGGAAATGGATGT-3'                                                |                                     | <a href="#">DETAILS</a>                                  |

**Figura 3.** Secuencias de VHA de RPA y ARNcr seleccionadas en base al modelo ADAPT para su análisis.

En cuanto a norovirus GI la selección y discriminación de secuencias resultó un poco más compleja. Se obtuvo un análisis múltiple entre las secuencias de referencia de los genogrupos GI.1-GI.9 (**Figura 4**). Esta región de aproximadamente 26 nucleótidos fue seleccionada como blanco de uno de los ARNcr. Esta región altamente conservada entre

genogrupos potencialmente resulta en una detección generalizada en todos los genogrupos, siempre y cuando los aislados cuenten con variaciones de un solo nucleótido que propicien un motivo conservado de 4C (CCCC) al final de la región. Dichas variaciones están presentes en todos los genogrupos, así como su forma conservada.



**Figura 4.** Región consenso conservada entre la secuencia codificante de RdRp y cápside de norovirus GI genogrupo 1 a 9.

Se utilizó como blanco la secuencia procesada proveniente del electroferograma de secuenciación del aislado clínico de norovirus GI.5 P4 (**Figura 5**).



**Figura 5.** Región de 523 pb de aislado secuenciado de norovirus GI. Dicha región perteneciente a RdRp/cápside fue utilizada como blanco en un ARNcr.

El total de secuencias utilizadas y diseñadas en este estudio se sintetizan en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Secuencias utilizadas y diseñadas en este trabajo.

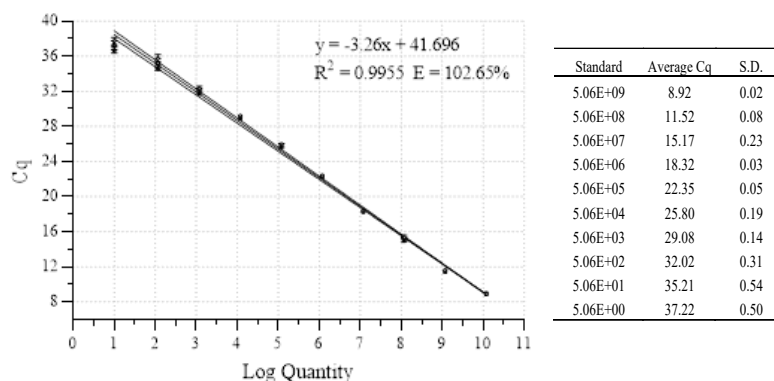
| <b>Blanco/<br/>Nombre</b>            | <b>Secuencia (5'-3')</b>                                                                                                     | <b>Referencia</b>                |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| MNV-1 RT-qPCR Forward                | AACGCTCAGCAGTCTTTGT                                                                                                          | Este estudio                     |
| MNV-1 RT-qPCR Reverse                | GGCGGTAGGAACAAGAT                                                                                                            | Este estudio                     |
| MNV-1 RT-qPCR Probe                  | FAM<br>AATGAGGATGAGTGATGGCGCAGCG<br>IBHQ                                                                                     | Este estudio                     |
| MNV-1 RPA<br>T7 promoter/<br>Forward | TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCT<br>TTGGAACAATGGATGCTGAGACCCCGC<br>AGG                                                            | Este estudio                     |
| MNV-1 RPA<br>Reverse                 | CCAGCCACGGGYTGAATGGGGACGGCC<br>TGT                                                                                           | Este estudio                     |
| MNV-1<br>ARNcr                       | rGrArUrUrUrArGrArCrUrArCrCrCrArArAr<br>ArArCrGrArArGrGrGrArCrUrArArArArCr<br>ArUrCrCrUrCrArUrUrCrArCrArArGrArCr<br>UrGrCrUrG | Este estudio                     |
| VHA RT-qPCR Forward<br>GAR2F         | ATA GGG TAA CAG CGG CGG ATA T                                                                                                | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |
| VHA RT-qPCR reverse<br>GAR1R         | CTC AAT GCA TCC ACT GGA TGA G                                                                                                | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |

|                                              |                                                                                                                                                                   |                                  |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| VHA RT-qPCR Probe<br>GARP                    | Cy5 AGA CAA AAA CCA TTC AAC GCC<br>GGA GG IB-RQ                                                                                                                   | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |
| VHA<br>ARNcr 1                               | rGrArU rUrUrA rGrArC rUrArC rCrCrC<br>rArArA rArArC rGrArA rGrGrG rGrArC<br>rUrArA rArArC rArUrG rGrArC rArUrA<br>rUrGrA rUrCrU rGrArU rGrUrA rUrGrU<br>rCrUrG rG | Este estudio                     |
| VHA<br>ARNcr 2                               | rGrArU rUrUrA rGrArC rUrArC rCrCrC<br>rArArA rArArC rGrArA rGrGrG rGrArC<br>rUrArA rArArC rArUrA rArArU rGrArU<br>rArGrU rArUrU rGrArU rArArG rArGrC<br>rUrGrU rG | Este estudio                     |
| Norovirus GI<br>RT-qPCR<br>forward<br>COG1Fa | CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA                                                                                                                                        | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |
| Norovirus GI<br>RT-qPCR<br>reverse<br>COG1Ra | CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C                                                                                                                                     | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |
| Norovirus GI<br>RT-qPCR<br>probe<br>COGPa    | FAM AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA<br>IB-RQ                                                                                                                           | (Williams-Woods<br>et al., 2022) |

|                               |                                                                                                                                                                   |              |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| GI.5 P4<br>Norovirus<br>ARNcr | GAU UUA GAC UAC CCC AAA AAC GAA<br>GGG GAC UAA AAC GGU AUU AUU AGG<br>AGA AAU AGU AAA UUC A                                                                       | Este estudio |
| GI.1-9<br>Norovirus           | rGrArU rUrUrA rGrArC rUrArC rCrCrC<br>rArArA rArArC rGrArA rGrGrG rGrArC<br>rUrArA rArArC rGrGrC rGrUrC rCrUrU<br>rArGrA rCrGrC rCrArU rCrArU rCrArU<br>rUrUrA rC | Este estudio |

### 7.2 Detección por RT- qPCR.

Se estableció una curva estándar de MNV-1 para la cuantificación por qPCR, la ecuación de la recta resultó  $y = -3.26x + 41.69$ , con una eficiencia de amplificación de 102.65 % y una  $R^2$  de 0.99 (**Figura 6**).



**Figura 6.** Curva estándar a partir de diluciones del fragmento MNV-1 purificado a partir de un gel y medido con NanoDrop™ 2000. Se utilizó un rango de dilución de 5,06E+09 a 5 copias genómicas / rx como estándares.

### 7.3 RT-qPCR de muestras de lechuga y mora azul pretratados con y sin ARNasa.

Para cuantificar el límite de detección (LOQ) del ensayo de detección de MNV-1 mediante RT-qPCR con pretratamiento con ARNasa, se inoculó una dilución seriada décuple de concentraciones conocidas en muestras de lechuga (**Tabla 5**) y mora azul (**Tabla 6**). El

rango de dilución fue de 8.59 y 2.59 log<sub>10</sub> de copias genómicas (gc) en 25 g de muestra de producto, equivalente a entre  $5.06 \times 10^6$  y 5 gc/rx. El LOQ para el ensayo de detección de MNV-1 mediante RT-qPCR, sin ARNasa ONE™, en muestras de lechuga, fue de 2.59 log<sub>10</sub> gc/25 g de muestra (5.06 gc/rx) de MNV-1 inoculado (**Tabla 5**). Con esta dosis, el MNV-1 eluido promedio fue de  $2.99 \pm 0.12$  log<sub>10</sub> gc/25 g. En las muestras de mora azul, el límite de cuantificación (LOQ) fue diez veces mayor, con 3.59 log<sub>10</sub> gc/25 g de muestra ( $5.06 \times 10^1$  gc/rx) de MNV-1 inoculado (**Tabla 6**). Con esta dosis, el MNV-1 eluido promedio fue de  $2.65 \pm 0.02$  log<sub>10</sub> gc/25 g. Con cada dosis, las muestras tratadas con ARNasa presentaron niveles más bajos de ARN detectable en comparación con las no tratadas (**Tablas 5 y 6**). Las muestras tratadas con ARNasa, en comparación con las no tratadas, presentaron una reducción porcentual, en todas las dosis, de entre el  $76.72 \pm 4.06$  % y el  $88.64 \pm 7.21$  % (lechuga) y del  $75.41 \pm 6.25$  % y el  $83.08 \pm 3.55$  % (mora azul). El MNV-1 tratado térmicamente a 80 °C (**Tablas 7 y 8**) se incluyó como control positivo de ARNasa. El MNV-1 tratado con ARNasa a 80 °C, en comparación con el no tratado, mostró una reducción significativa en el título en todas las dosis (lechuga: 93.5-95.3 %; mora azul: 96.2-96.9 %). El título viral de MNV-1 que fue tratado térmicamente a 80 °C (**Tablas 7 y 8**), en comparación con el no tratado térmicamente (**Tablas 5 y 6**), no fue significativamente diferente ni para la lechuga ni para mora azul.

**Tabla 5.** Cuantificación de MNV-1 por qPCR en muestras de lechugas pre-tratadas con ARNasa y sin tratamiento. Porcentaje de recuperación y reducción por tratamiento son mostrados.

| <b>Inóculo total<sup>a</sup></b> | <b>Lechuga</b>                     |                                | <b>Lechuga RNase ONE™</b>          |                                         |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                  | <b>log10 gc/ 25g<br/>± DE (Cq)</b> | <b>% Recuperación<br/>± DE</b> | <b>log10 gc/ 25g<br/>± DE (Cq)</b> | <b>% Reducción<br/>± DE<sup>c</sup></b> |
| 8.59                             | 6.54 ± 0.28 (26.81)                | 1.00 ± 0.50                    | 5.91 ± 0.25 (28.72)                | 76.72 ± 4.06                            |
| 7.59                             | 5.90 ± 0.29 (28.98)                | 2.33 ± 1.21                    | 4.99 ± 0.16 (31.85)                | 88.64 ± 7.21                            |
| 6.59                             | 4.93 ± 0.31 (32.21)                | 2.52 ± 1.39                    | 4.23 ± 0.18 (34.47)                | 81.92 ± 7.21                            |
| 5.59                             | 4.32 ± 0.37 (34.46)                | 6.72 ± 4.89                    | 3.45 ± 0.21 (37.83)                | 88.25 ± 8.61                            |
| 4.59                             | 3.72 ± 0.29 (35.68)                | 15.46 ± 9.44                   | 2.92 ± 0.09 (39.44)                | 85.87 ± 11.49                           |
| 3.59                             | 3.25 ± 0.36 (36.81)                | 58.62 ± 50.56                  | No detectado                       | No detectado                            |
| 2.59                             | 2.99 ± 0.12 (38.68)                | No detectado                   | No detectado                       | No detectado                            |

<sup>a</sup> El inóculo total se calculó como copias genómicas de MNV-1 y se expresó como log10 gc/ en 25 g.

<sup>b</sup> Véase métodos. El % de recuperación comparó el gc de MNV-1 cuantificado tras la elución de la muestra de producto con el gc de MNV-1 utilizado para inocular dicha muestra.

<sup>c</sup> Véase métodos. El % de reducción comparó el gc de MNV-1 cuantificado tras el tratamiento con ARNasa con el gc de MNV-1 cuantificado sin dicho tratamiento.

**Tabla 6.** Cuantificación de MNV-1 por qPCR en muestras de mora azul pre tratadas con ARNasa y sin tratamiento. Porcentaje de recuperación y reducción por tratamiento son mostrados.

| Inóculo total <sup>a</sup> | Mora azul                  |                        | Mora azul RNase ONE™       |                                  |
|----------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------------|
|                            | log10 gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Recuperación<br>± DE | log10 gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Reducción<br>± DE <sup>c</sup> |
| 8.59                       | 5.95 ± 0.12 (29.45)        | 0.23 ± 0.06            | 5.34 ± 0.08 (31.07)        | 75.41 ± 6.25                     |
| 7.59                       | 5.31 ± 0.08 (31.65)        | 0.52 ± 0.09            | 4.54 ± 0.05 (33.83)        | 83.08 ± 3.55                     |
| 6.59                       | 4.32 ± 0.04 (34.68)        | 0.53 ± 0.04            | 3.65 ± 0.04 (36.86)        | 78.56 ± 3.53                     |
| 5.59                       | 3.58 ± 0.15 (36.62)        | 1.00 ± 0.33            | 2.89 ± 0.06 (39.35)        | 80.30 ± 11.46                    |
| 4.59                       | 3.05 ± 0.23 (38.20)        | 3.13 ± 1.42            | No detectado               | No detectado                     |
| 3.59                       | 2.65 ± 0.02 (40.05)        | 11.69 ± 0.66           | No detectado               | No detectado                     |
| 2.59                       | No detectado               | No detectado           | No detectado               | No detectado                     |

<sup>a</sup> El inóculo total se calculó como copias genómicas de MNV-1 y se expresó como log10 gc/ en 25 g.

<sup>b</sup> Véase métodos. El % de recuperación comparó el gc de MNV-1 cuantificado tras la elución de la muestra de producto con el gc de MNV-1 utilizado para inocular dicha muestra.

<sup>c</sup> Véase métodos. El % de reducción comparó el gc de MNV-1 cuantificado tras el tratamiento con ARNasa con el gc de MNV-1 cuantificado sin dicho tratamiento.

Para evaluar el efecto de la inactivación por calor a 80 °C sobre la recuperación y detección de MNV-1, se realizó una serie de diluciones de concentraciones conocidas, que van de  $3.90 \times 10^8$  a  $3.86 \times 10^2$  copias genómicas totales (25 g o dosis de inoculación) en muestras de lechuga (**Tabla 7**) y mora azul (**Tabla 8**). En las muestras de lechuga tratadas con calor, el límite de detección (LOD) para el ensayo de qPCR de MNV-1 sin tratamiento con ARNasa ONE™ fue de  $3.90 \times 10^2$  copias genómicas (Tabla x, cuantificación promedio de log10  $3.00 \pm 2.47$  gc/25 g). En el caso de las muestras de mora azul, el LOD sin ARNasa ONE™ fue de  $3.86 \times 10^3$  copias genómicas (Tabla 6, cuantificación promedio de log10 2.78 gc/25 g). Cuando el virus eluido de las muestras tratadas con calor se sometió además a un tratamiento con ARNasa ONE™, se observó una reducción en la

detección en comparación con el ensayo sin ARNasa ONE™ en cada dosis de inoculación. En las muestras de lechuga, el LOD con tratamiento de ARNasa ONE™ fue de  $3.90 \times 10^4$  copias genómicas (**Tabla 7**, cuantificación promedio de  $\log_{10} 2.78 \pm 2.04$  gc/25 g), mientras que en las muestras de mora azul fue de  $3.90 \times 10^5$  copias genómicas (**Tabla 8**, cuantificación promedio de  $\log_{10} 2.89 \pm 2.03$  gc/25 g). Las muestras tratadas con ARNasa mostraron una reducción porcentual de detección que varió entre  $93.52 \pm 3.70$  % y  $95.24 \pm 0.60$  % para lechuga, y entre  $96.16 \pm 0.56$  % y  $96.88 \pm 0.88$  % para mora azul, en comparación con las muestras no tratadas con ARNasa (**Tabla 7 y 8**).

**Tabla 7.** Reducción de MNV-1 en muestras de lechuga inoculadas después del pretratamiento con ARNasa de MNV inactivado por calor.

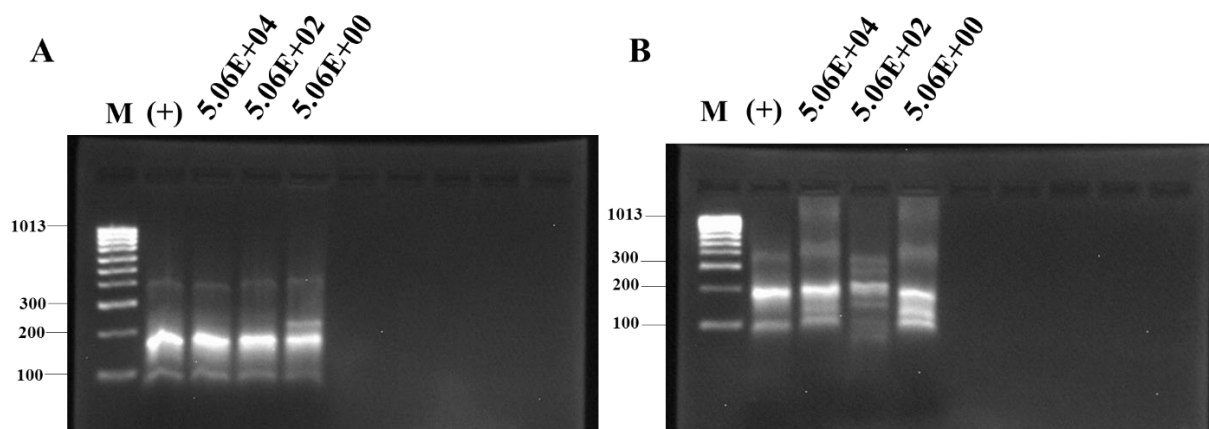
| Inactivación 80 °C |                                  |                        |                                  |                     |
|--------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Inóculo total      | Lechuga                          |                        | Lechuga RNase ONE™               |                     |
|                    | $\log_{10}$ gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Recuperación<br>± DE | $\log_{10}$ gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Reducción<br>± DE |
| 8.59               | $6.75 \pm 0.44$ (25.74)          | $1.86 \pm 1.26$        | $5.31 \pm 0.24$ (30.22)          | $95.24 \pm 0.60$    |
| 7.59               | $6.03 \pm 0.44$ (28.28)          | $3.61 \pm 2.40$        | $4.73 \pm 0.31$ (32.17)          | $94.26 \pm 2.32$    |
| 6.59               | $5.11 \pm 0.15$ (32.15)          | $3.47 \pm 1.27$        | $3.80 \pm 0.25$ (36.79)          | $95.31 \pm 1.08$    |
| 5.59               | $4.57 \pm 0.12$ (33.93)          | $9.82 \pm 2.93$        | $3.17 \pm 0.37$ (37.65)          | $94.44 \pm 2.63$    |
| 4.59               | $3.83 \pm 0.43$ (34.74)          | $23.98 \pm 22.50$      | $2.72 \pm 0.08$ (39.47)          | $93.52 \pm 3.70$    |
| 3.59               | $3.33 \pm 0.49$ (36.10)          | $85.60 \pm 92.43$      | -                                | -                   |
| 2.59               | $2.99 \pm 0.13$ (38.65)          | $261.74 \pm 76.65$     | -                                | -                   |

**Tabla 8.** Reducción de MNV-1 en muestras de mora azul inoculadas después del pretratamiento con ARNasa de MNV inactivado por calor.

| Pre-tratamiento con calor 80 °C |                            |                        |                            |                     |
|---------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| Inóculo total                   | Mora azul                  |                        | Mora azul RNase ONE™       |                     |
|                                 | log10 gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Recuperación<br>± DE | log10 gc/ 25g<br>± DE (Cq) | % Reducción<br>± DE |
| 8.59                            | 5.88 ± 0.12 (29.33)        | 0.19 ± 0.05            | 4.38 ± 0.09 (34.71)        | 96.88 ± 0.88        |
| 7.59                            | 5.22 ± 0.05 (31.62)        | 0.42 ± 0.04            | 3.73 ± 0.06 (36.34)        | 96.76 ± 0.35        |
| 6.59                            | 4.33 ± 0.11 (34.83)        | 0.55 ± 0.15            | 2.92 ± 0.06 (39.37)        | 96.16 ± 0.56        |
| 5.59                            | 3.49 ± 0.07 (37.22)        | 0.79 ± 0.12            | -                          | -                   |
| 4.59                            | 2.93 ± 0.17 (38.95)        | 2.30 ± 0.82            | -                          | -                   |
| 3.59                            | 2.78 (39.64)               | 15.76                  | -                          | -                   |
| 2.59                            | -                          | -                      | -                          | -                   |

#### 7.4 Detección por RPA.

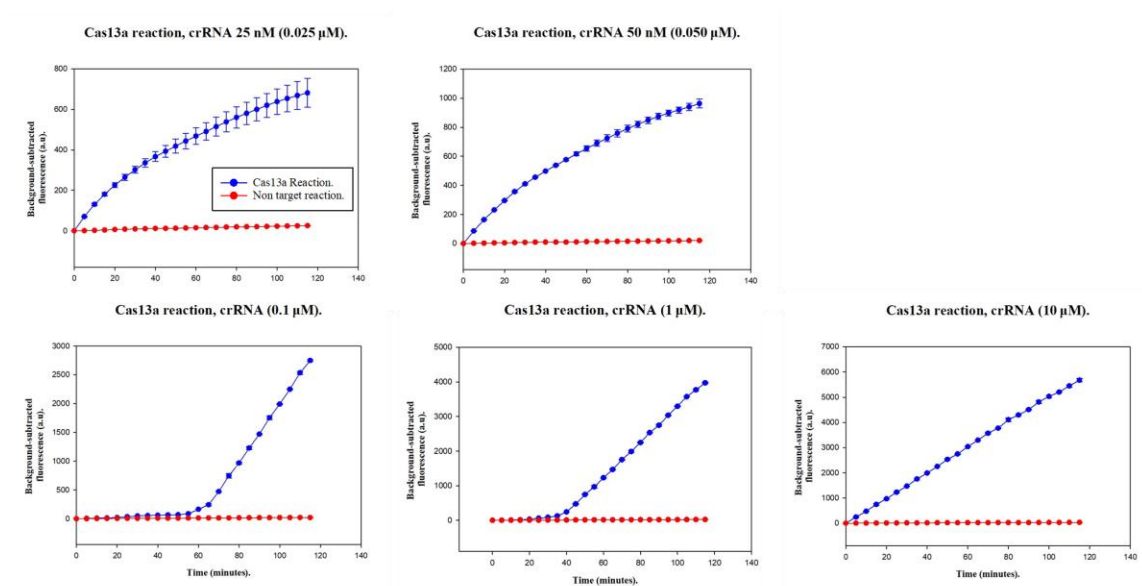
Descubrimos que la amplificación isotérmica de RPA por sí sola es lo suficientemente sensible para la detección de MNV-1 en la dilución inoculada más baja de 5.06 gc/ rx en muestras eluidas de lechuga y mora azul (**Figura 7**).



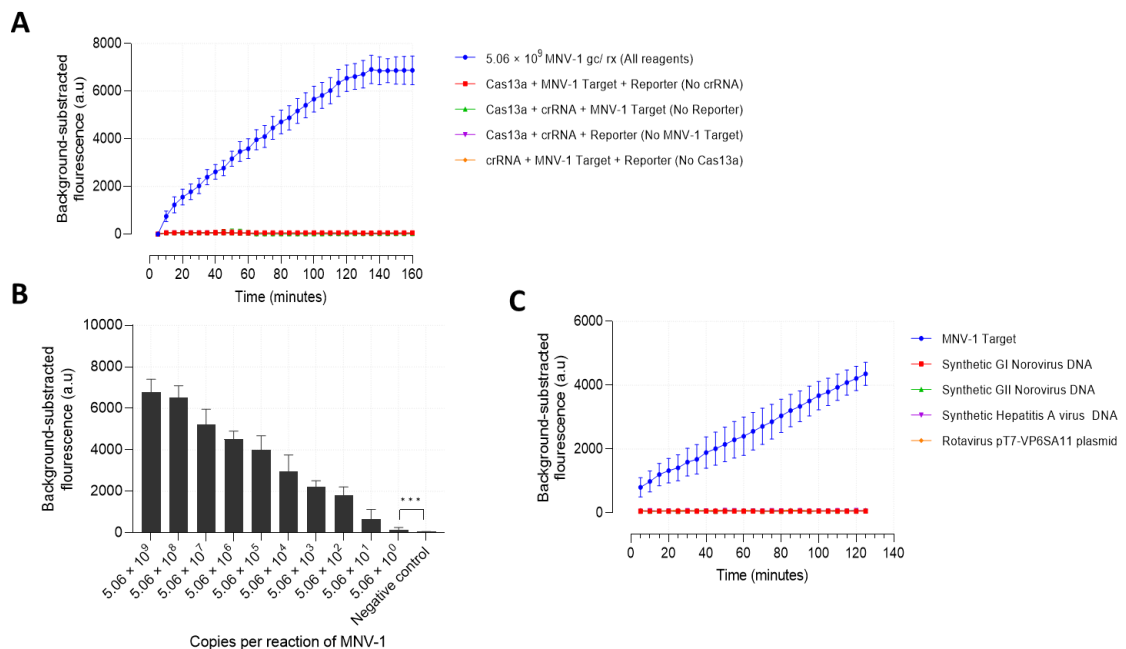
**Figura 7.** Amplificación isotérmica mediante RPA de ARN viral MNV-1 de  $5.06 \times 10^9$  (+) y  $5.06 \times 10^4$ ,  $5.06 \times 10^2$ ,  $5.06$  gc/rx eluidos de muestras de lechuga (A) y mora azul (B) inoculadas, visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Los valores estándar de pares de bases de ADN se enumeran a la izquierda de cada gel.

### 7.5 Optimización de detección por Cas13a.

La detección basada en Cas13a se diseñó para ser una detección en un solo paso que utiliza pre-amplificación isotérmica RPA en combinación con Cas13a. Antes de probar la detección basada en Cas13a en muestras de frutas y verduras, optimizamos la detección de MNV-1 junto con la concentración de crRNA (p. ej., 10  $\mu$ M exhibió los mayores rendimientos de señal, figura complementaria 4), el tiempo de detección, los límites de detección (LOD, ver materiales y métodos) y la especificidad con nuestra diana (**Figura 8**). Confirmamos que MNV-1 se detectó con todos los reactivos necesarios, pero no cuando alguno de ellos faltaba (**Fig. 9A**). Dado que la detección basada en Cas13a, a diferencia de la RT-qPCR, no puede proporcionar una cuantificación absoluta de las cantidades virales, en lugar del LOQ, como medida de la sensibilidad del ensayo, calculamos el límite de detección (LOD). Seleccionamos 120 min como tiempo de corte para la detección porque la señal de fluorescencia alcanzó una meseta en ese momento. Para establecer el LOD de la detección basada en Cas13a, se analizó MNV-1 diluido en serie diez veces ( $\log_{10}$  8.59 a 2.59 gc/25 g) (**Fig. 9B**). El LOD fue de al menos  $5.06 \times 100$  gc/rx (total de  $\log_{10}$  2.59 gc/25 g). Por lo tanto, una señal de  $144.05 \pm 107.26$  unidades arbitrarias de fluorescencia (a.u.) fue la señal positiva mínima de nuestro método; las muestras por debajo de 144,05 u.a. de fluorescencia se consideraron negativas. La especificidad del ensayo para MNV-1 se confirmó cuando el ensayo detectó la diana de MNV-1 pero no las dianas de ADN sintético de norovirus GI y GII, virus de la hepatitis A y un rotavirus plasmídico pT7-VP6SA11 (**Fig. 9C**).



**Figura 8.** Evaluación de los rendimientos de la señal fluorescente de un rango de concentraciones de ARNcr (0.025 a 10 μM). La concentración de ARNcr de 10 μM, en comparación con otras concentraciones, exhibió los mayores rendimientos de señal.



**Figura 9.** Optimización de la detección basada en Cas13a. (A) La señal de fluorescencia con sustracción de fondo aumentó con el tiempo y alcanzó una meseta aproximadamente a los 120 minutos, pero solo en una mezcla de reacción con todos los reactivos necesarios.

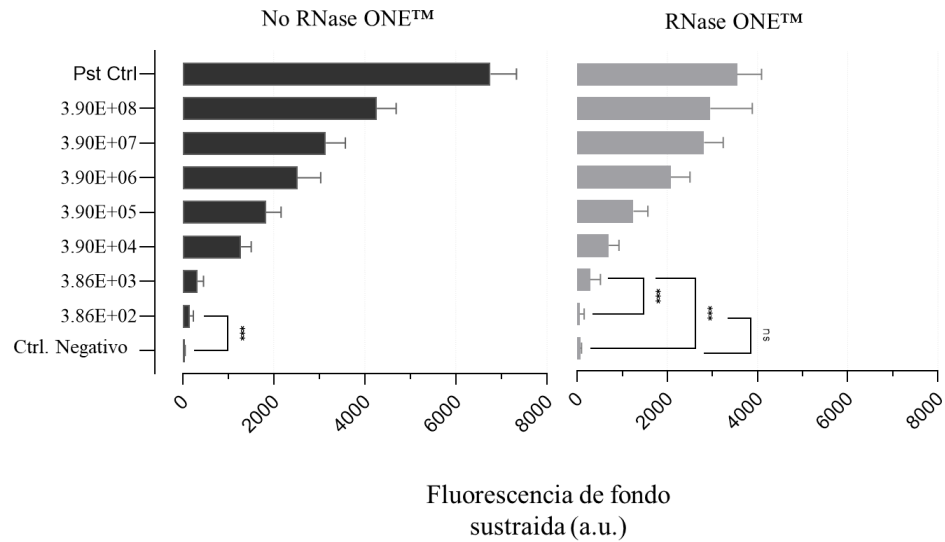
(B) El límite de detección fue de 5.06 para la detección con Cas13a del blanco MNV-1; \*\*\*  $p < 0.001$ . (C) La detección basada en Cas13a detectó MNV-1, pero no los objetivos sintéticos de norovirus HAV, GI y GII y el plásmido que contenía VP6 de rotavirus.

#### *7.6 CRISPR en muestras de lechuga y mora azul (CRISPR FRESH).*

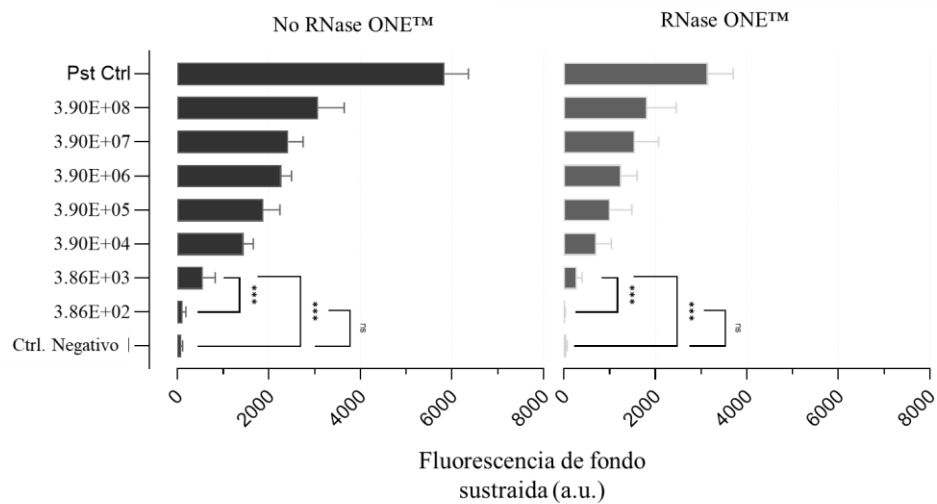
El método al que denominamos CRISPR FRESH Detección enzimática de virus ARN transmitidos por alimentos para un alto rendimiento en productos frescos, por sus siglas en inglés (Foodborne RNA-virus Enzymatic Sensing for High-throughput on fresh produce), que consiste en la integración del pretratamiento con ARNasa, la preamplificación con RPA y la detección de Cas13a, se evaluó en muestras inoculadas de lechuga (**Fig. 10A**) y mora azul (**Fig. 10B**). En consonancia con la RT-qPCR previa sin pretratamiento con ARNasa, nuestro método CRISPR-Cas13a, sin pretratamiento con ARNasa, detectó, para lechuga,  $2.59 \log_{10}$  gc/muestra de 25 g ( $5.06 \text{ gc/rx}$ ) y, para mora azul,  $3.59 \log_{10}$  gc/muestra de 25 g ( $5.06 \times 10^1 \text{ gc/rx}$ ) (**Tabla 9**). Sin embargo, al pretratar las muestras con RNase ONE™ (CRISPR FRESH), se observó una señal positiva correspondiente a  $3.59 \log_{10}$  gc/muestra de 25 g ( $5.06 \times 10^1 \text{ gc/rx}$ ) tanto para lechuga como para mora azul. El ensayo basado en CRISPR detectó una dosis de RNasa menor que la del ensayo RT-qPCR (Tabla 2: lechuga:  $4.59 \log_{10}$  gc/muestra de 25 g [ $5.06 \times 10^2 \text{ gc/rx}$ ]; Tabla 3: mora azul:  $5.59 \log_{10}$  gc/muestra de 25 g [ $5.06 \times 10^3 \text{ gc/rx}$ ]) (**Tabla 9**). El MNV-1 tratado con ARNasa a 80 °C (control positivo de ARNasa), en comparación con el no tratado, mostró una reducción significativa de la fluorescencia en las distintas dosis (lechuga: 93.5-95.3 %; mora azul: 96.1-96.8 %). La fluorescencia del MNV-1 tratado térmicamente a 80 °C (**Figura 11A y 11B**), en comparación con el no tratado térmicamente (**Figuras 10A y 10B**), no mostró diferencias significativas en el MNV-1 para lechuga ni para mora azul.

**A**

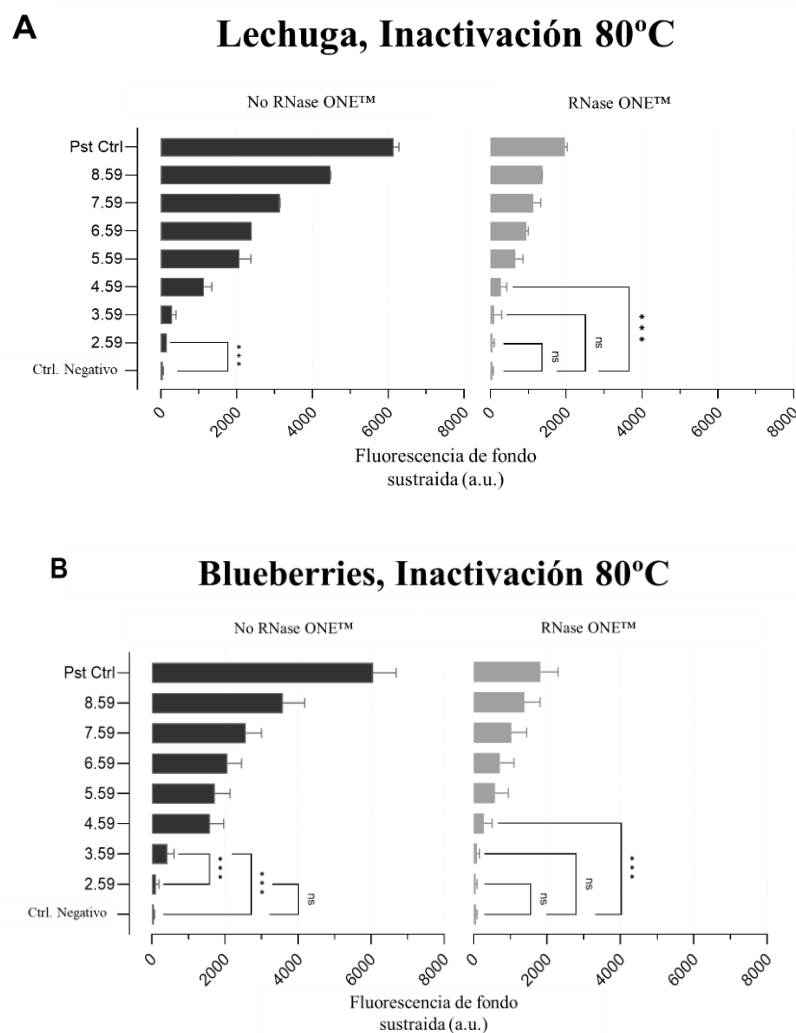
## Lechuga

**B**

## Blueberries



**Figura 10.** Detección basada en Cas13a de MNV-1 inoculado en lechuga (A) y mora azul (B). En cada panel, se compararon muestras que no fueron tratadas con muestras que fueron tratadas con ARNasa. Las muestras muestran una disminución en la señal de fluorescencia entre las muestras no tratadas y las tratadas con ARNasa (A, B) y una señal fluorescente en la dilución más baja de las muestras tratadas con ARNasa (B). Una señal de  $144,05 \pm 107,26$  unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.) fue la señal positiva mínima de nuestro método CRISPR.



**Figura 11.** Detección CRISPR de MNV-1 inactivado por calor. (A) MNV-1 tratado por calor detectado por Cas13a en muestras de lechuga tratadas con ARNasa y sin tratar. (B) MNV-1 tratado por calor detectado por Cas13a en muestras de mora azul tratadas con ARNasa y sin tratar. Se muestran las señales de fluorescencia con sustracción de fondo (unidades arbitrarias, u.a.) para diluciones seriadas del control positivo (Pst Ctrl, 11,59 Log10 MNV-1/25 g de alimento) y el control negativo (Ctrl. Negativo) en muestras sin tratar (barras negras) y tratadas con ARNasa ONE™ (barras grises). El eje Y de cada gráfico representa la concentración de gc del virus enriquecido por 25 g de alimento. Una señal de  $144,05 \pm 107,26$  u.a. fue la señal positiva mínima de nuestro método CRISPR. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de

Dunnett. \*\*\*,  $p < 0,001$ . El MNV-1 tratado con ARNasa a 80 °C (control positivo de ARNasa), en comparación con el no tratado, mostró una reducción significativa.

Finalmente, se muestra una comparación visual entre los rendimientos de detección de ambas técnicas, RT-qPCR y CRISPR con y sin pre-tratamiento de ARNasa en muestras de lechuga y mora azul (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Resumen comparativo entre la detección con y sin ARNasa por medio de RT-qPCR y CRISPR en muestras de lechuga y mora azul.

| Inóculo total <sup>b</sup> | RT-qPCR <sup>a</sup> |            |               |            | CRISPR <sup>a</sup> |            |               |            |
|----------------------------|----------------------|------------|---------------|------------|---------------------|------------|---------------|------------|
|                            | Lechuga              |            | Mora azul     |            | Lechuga             |            | Mora azul     |            |
|                            | No RNase ONE™        | RNase ONE™ | No RNase ONE™ | RNase ONE™ | No RNase ONE™       | RNase ONE™ | No RNase ONE™ | RNase ONE™ |
| 8.59                       | +                    | +          | +             | +          | +                   | +          | +             | +          |
| 7.59                       | +                    | +          | +             | +          | +                   | +          | +             | +          |
| 6.59                       | +                    | +          | +             | +          | +                   | +          | +             | +          |
| 5.59                       | +                    | +          | +             | +          | +                   | +          | +             | +          |
| 4.59                       | +                    | +          | +             | -          | +                   | +          | +             | +          |
| 3.59                       | +                    | -          | +             | -          | +                   | +          | +             | +          |
| 2.59                       | +                    | -          | -             | -          | +                   | -          | -             | -          |

<sup>a</sup> Los criterios de positividad para la detección de MNV-1 ("+";  $Cq \leq 40$ ) y la no detección ("-",  $Cq > 40$ ) son los mismos para los ensayos basados en RT-qPCR y CRISPR.

<sup>b</sup> El inóculo total se calculó como copias genómicas de MNV-1 y se expresó como log10 gc/ en 25 g.

### 7.7 Eficiencia de recuperación.

Comparamos las eficiencias de recuperación de lechuga y mora azul mediante RT-qPCR y, por separado, mediante CRISPR. Los resultados, y por lo tanto las eficiencias de recuperación, de estos ensayos no pueden compararse directamente debido a las diferentes unidades de medida (RT-qPCR: gc/25 g de alimento; CRISPR: fluorescencia/25 g de alimento). Mediante el ensayo RT-qPCR, el rango de rendimiento de recuperación, en todas las dosis, de MNV-1 eluido y detectado fue del 1,00 % al 58,62 % en muestras de lechuga y del 0,23 % al 11,69 % en muestras de mora azul (Tablas 2 y 3). Mediante RT-

qPCR, en todas las dosis, los rendimientos de recuperación de lechuga fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que los de mora azul. Utilizando el ensayo CRISPR, el rango de rendimiento de recuperación, en todas las dosis, del MNV-1 eluido y detectado mediante CRISPR fue del 50,6 % al 94,4 % en muestras de lechuga y del 60,8 % al 91,8 % en muestras de mora azul (Figura 2, datos no mostrados). Mediante CRISPR, en todas las dosis, no se observaron diferencias significativas entre los rendimientos de recuperación de lechuga y mora azul. Dado que la RT-qPCR y la detección mediante CRISPR se basan en diferentes principios y unidades de medición, los rendimientos de recuperación se describen de forma independiente para cada método, sin que ello implique una comparación cuantitativa directa.

## 8. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue detectar MNV-1 en alimentos (lechuga y mora azul) con una cápside intacta, un indicador de infectividad, a través de un método de detección basado en CRISPR-Cas13a junto con un ensayo de integridad de la cápside de ARNasa. Denominamos este ensayo: Detección enzimática de virus ARN transmitidos por alimentos CRISPR para alto rendimiento en productos frescos (CRISPR FRESH). Descubrimos que este ensayo basado en CRISPR fue sensible para detectar MNV-1 en lechuga y mora azul y no reaccionó de forma cruzada con otro material genético. También observamos que este ensayo basado en CRISPR, en comparación con el basado en RT-qPCR, pudo detectar las mismas dosis de inoculación de MNV-1 en muestras de lechuga (2.59 log<sub>10</sub> gc/25 g) o mora azul (3.59 log<sub>10</sub> gc/25 g) (**Tabla 9**), pero tuvo diferencias específicas del ensayo por tipo de producto. Por último, el ensayo CRISPR, en comparación con el ensayo basado en RT-qPCR, tras el tratamiento con ARNasa, detectó ARN de MNV-1 a una dosis de inoculación menor en muestras de lechuga y mora azul.

Otros informes sobre norovirus sugirieron resultados de LOD (sensibilidad) del ensayo basado en CRISPR comparables a los de este informe (2.59 log<sub>10</sub> gc/25 g, 5.06 gc/reacción en 120 minutos). Estos informes emplearon detección de Cas13a o Cas12a y emplearon lectores de fluorescencia o tiras de flujo lateral (LFS) para la lectura (Duan et al., 2022; Qian et al., 2021). Por ejemplo, Jia et al. (2020) informaron una sensibilidad de 50 gc/reacción de norovirus GII en muestras de heces humanas en 20 minutos utilizando RPA y una prueba de flujo lateral. Han et al. (2020) informaron una sensibilidad de 166 copias/μl de norovirus GII en mariscos, agua y heces en 20 minutos utilizando RT-RPA. Ma et al. (2018) informaron una sensibilidad de 100 gc de MNV-1 en muestras de tejido fecal, fecal y gástrico de ratones en 16 minutos utilizando RPA. Duan et al. (2022) informaron una sensibilidad de 5 gc/reacción de GII.4 en muestras de heces en 40 minutos utilizando RPA-Cas13a, un lector de fluorescencia y LFS. Además, Li et al. (2024) informaron una sensibilidad de 2,5 gc/reacción de norovirus GII.4 y GII.17 en muestras de heces en 40 minutos utilizando RPA-Cas13a y un transiluminador portátil de luz azul. El menor tiempo de detección (16-40 minutos) de estos estudios, en comparación con el de nuestro estudio (120 minutos), podría atribuirse a la variación de los picos de la señal de fluorescencia o del ARNcr diseñado, lo cual afecta la eficiencia de la escisión y la

intensidad de la fluorescencia (Gootenberg et al., 2017; Ke et al., 2021; Leski et al., 2023; Tambe et al., 2018; Yang et al., 2023). La ausencia de reacción cruzada de nuestro ensayo con ARN de otros virus entéricos fue consistente con otros ensayos de detección de norovirus basados en CRISPR (Cas13a o Cas12a) para muestras de heces, que tampoco presentaron reacción cruzada con otras especies de virus, como rotavirus, enterovirus e incluso otras variantes de norovirus dentro del mismo genogrupo GII (Duan et al., 2022; Qian et al., 2021). Este ensayo basado en CRISPR y el basado en RT-qPCR pudieron detectar las mismas dosis de inoculación de MNV-1 tanto en muestras de lechuga (2.59 log<sub>10</sub> gc/25 g) como de mora azul (3.59 log<sub>10</sub>/25 g), pero presentaron diferencias específicas según el tipo de producto (**Tablas 5 y 6**). La similitud en la eficiencia de detección entre los ensayos basados en CRISPR y RT-qPCR, como hemos observado, ha sido documentada por otros grupos (Duan et al., 2022; Gootenberg et al., 2017). Tanto los ensayos basados en CRISPR como en RT-qPCR mostraron un LOD de MNV-1 más alto en lechuga (Tabla 4), en comparación con mora azul. Planteamos la hipótesis de que la detección de MNV-1 fue similar en todos los ensayos, pero que la elución viral de MNV-1 fue superior en lechuga, en comparación con las muestras de mora azul. En apoyo de esta hipótesis, cuando se pudo cuantificar el título viral (mediante ensayos basados en RT-qPCR, pero no en CRISPR), observamos un porcentaje de recuperación específica de MNV-1 significativamente mayor en lechuga, en comparación con las muestras de mora azul (**Tablas 5 y 6**). Estos hallazgos sugieren que las características de la matriz del tipo de alimento pueden influir en la recuperación viral. Similar a nuestros resultados, otro grupo también observó eficiencias de extracción superiores de MNV-1, MS2 y el virus de Tulane en lechuga en comparación con moras (Tang et al., 2023).

El ensayo CRISPR, en comparación con el ensayo RT-qPCR, pudo detectar una menor concentración de gc inoculado con MNV-1 de ARN de MNV-1 en muestras de lechuga o mora azul eluidas y tratadas con ARNasa. Es improbable que los ensayos basados en CRISPR, en comparación con los basados en RT-qPCR, sean más sensibles para detectar ARN intacto en cápsides intactas de MNV-1, después del tratamiento con ARNasa. La razón de esto es que ya hemos demostrado y afirmado, con base en la evidencia de otros (Duan et al., 2022; Gootenberg et al., 2017), que tanto los ensayos basados en CRISPR como los basados en RT-qPCR tienen la misma sensibilidad para detectar el ARN de

MNV-1. En cambio la adición de ARNasa resultó en una reducción incompleta del ARN libre de MNV-1 y la generación de fragmentos de ARN de MNV-1. Definimos el ARN libre como ARN accesible a la ARNasa fuera de una cápside o dentro de una cápside "permeable" dañada. En apoyo de esta hipótesis, nosotros y otros hemos demostrado que el tratamiento con ARNasa del MNV-1 inoculado en productos agrícolas no resulta en una reducción completa (100%) del ARN de MNV-1 (Li et al., 2012; Marti et al., 2017; Monteiro y Santos, 2018). Nuestro control de inactivación por calor (80 °C), al comparar muestras tratadas con ARNasa con muestras sin tratar, mostró una reducción del 93.5-96.8 % (1.19-1.86 log<sub>10</sub>) del ARN de MNV-1 en diferentes dosis de MNV-1 en muestras de lechuga y mora azul. Marti et al. informaron, en muestras de lechuga eluidas con MNV-1, una reducción del 99.99 % (5.7 log<sub>10</sub>) mediante RT-qPCR y utilizando ARNasa A y luz UV (Marti et al., 2017). Otros estudios en muestras no alimentarias también han informado una variación de 0.03-0.45 log<sub>10</sub> en la reducción de norovirus tratados por calor mediante el pretratamiento con ARNasa (Li et al., 2012; Monteiro y Santos, 2018). Estos resultados sugieren que la ARNasa no destruyó todo el ARN accesible o que el tratamiento térmico (80 °C) no proporciona acceso completo a todo el ARN a la ARNasa. Una posibilidad adicional es que el stock de MNV-1 utilizado en nuestros experimentos contuviera una mayor proporción de partículas defectuosas, posiblemente debido a múltiples pases en el cultivo celular, lo que podría afectar la eficiencia de la inactivación térmica y el tratamiento con ARNasa. Si se demuestra que la hipótesis de que la ARNasa no destruye todo el ARN accesible es válida, entonces los ensayos basados en CRISPR y RT-qPCR, combinados con el tratamiento con ARNasa para detectar cápsides intactas (es decir, virus potencialmente infecciosos), pueden conducir a resultados falsos positivos: detección de fragmentos de ARN degradados de forma incompleta en lugar de ARN protegido en cápsides intactas. Para explicar nuestros resultados, proponemos que los ensayos basados en CRISPR, en comparación con los basados en RT-qPCR, pueden ser más eficaces en la detección de fragmentos de MNV-1 generados por ARNasa y, por lo tanto, es más probable que generen resultados falsos positivos (es decir, virus potencialmente infecciosos). Para abordar estas hipótesis, nuestras futuras áreas de investigación consisten en desarrollar metodologías para ajustar los resultados del tratamiento con ARNasa según la eficacia de la reducción del ARN libre (p. ej., controles

tratados con ARNasa) y mejorar las condiciones y los controles de ARNasa para eliminar y confirmar la eliminación del ARN libre. También pretendemos validar aún más estos resultados basados en CRISPR con los resultados de infectividad de MNV-1.

Nuestra reducción de ARNasa en lechuga y mora azul inoculados con MNV-1 (75.41-88.64 %, reducción de 0.61-0.91 log<sub>10</sub>, **Tabla 5 y 6**), medida mediante RT-qPCR, fue superior a la de otros trabajos publicados. Monteiro y Santos (2018), utilizando norovirus GII aislado de heces de pacientes infectados con gastroenteritis y virus de la hepatitis A (VHA) HM175/18f (VR-1402) de cultivo celular, lograron una media de 0.03 reducción logarítmica en norovirus GII y 0.95 reducción logarítmica en VHA en muestras no alimentarias. Li et al. (2012), utilizando MNV-1 de cultivo de tejidos, informaron una reducción logarítmica de aproximadamente 0.04 utilizando suspensión de MNV-1 y RT-PCR de RNasa ONE in vitro. Planteamos dos posibles explicaciones para nuestra mayor reducción inducida por ARNasa del ARN de MNV-1 en comparación con estudios previos. Primero, es posible que nuestras condiciones de reacción de ARNasa (p. ej., concentración enzimática, tiempo de incubación, temperatura o composición del tampón) fueran más efectivas, en comparación con la condición de reacción de estudios previos, en la degradación del ARN libre, lo que lleva a una mayor reducción del ARN. En segundo lugar, es posible que nuestro proceso de múltiples pases en cultivos celulares MNV-1 o el proceso de elución en lechuga y mora azul haya dado como resultado una mayor proporción de partículas defectuosas y ARN accesible a la ARNasa, ya sea por daño parcial de las cápsides virales durante la manipulación o por efectos intrínsecos de la matriz que exponen el ARN a la ARNasa con mayor facilidad. Serán necesarios estudios de optimización y validación adicionales para distinguir entre estas dos posibilidades.

Este estudio presentó fortalezas y limitaciones. La primera fortaleza fue que CRISPR FRESH aprovecha la precisión de Cas13a para lograr una detección cualitativa, sensible y específica del ARN viral, lo que proporciona un indicador fiable de la presencia de una diana. La segunda fortaleza fue la relación directa entre la concentración de ARN diana y la capacidad de detección de la enzima (Fig. 1), lo que sienta las bases para un ensayo cuantitativo fiable. La tercera fortaleza fue la evaluación de la recuperación y detección viral en diferentes tipos de productos agrícolas con múltiples dosis. Una limitación de este estudio fue que no pudimos comparar directamente los resultados de RT-qPCR con los

resultados de CRISPR FRESH (por ejemplo, recuperación viral) porque actualmente es cualitativo y aún no es posible una cuantificación precisa sin una mayor optimización. Una segunda limitación radica en las dificultades para desarrollar un ensayo cuantitativo basado en CRISPR, debido a la necesidad de calibrar cada estándar en cada etapa del ensayo (p. ej., preamplificación, transcripción de T7, detección). Una tercera limitación podría ser la incapacidad metodológica para lograr una reducción del 100 % del ARN libre en las matrices de muestra (p. ej., diferentes tipos de productos), lo que requiere nuevas metodologías para ajustar este factor de confusión.

Existen varias áreas de investigación futuras para aplicar este ensayo al norovirus humano en alimentos. Una de ellas es permitir el análisis cuantitativo de patógenos en muestras de alimentos mediante la optimización de las concentraciones de cebadores y las condiciones de reacción para evitar efectos de saturación (p. ej., en la etapa de preamplificación) y la estimación de las proporciones de Cas13 activa respecto al ARN diana. Una segunda área es desarrollar un flujo de trabajo de calibración que proporcione análisis paralelos fiables de concentraciones diana variables. Una tercera área es validar el método en diferentes matrices alimentarias para garantizar su precisión y fiabilidad, incluyendo la cuantificación de la eficiencia de elución viral para cada matriz alimentaria. Un objetivo a largo plazo sería integrar CRISPR FRESH en las herramientas de detección existentes para los profesionales de la seguridad alimentaria en la industria y el gobierno. Esto incluiría un análisis coste-beneficio de su uso en comparación con los métodos tradicionales de detección viral.

## 9. CONCLUSIONES.

En conclusión, CRISPR FRESH demuestra una detección sensible y específica de norovirus en productos frescos. La capacidad de CRISPR FRESH para detectar virus es comparable a la de la RT-qPCR. Además, CRISPR FRESH ofrece la opción de sustituir equipos costosos de RT-qPCR (p. ej., termocicladores) por equipos más económicos para condiciones de reacción con control de temperatura (p. ej., termobloques) y lectura (p. ej., fluorómetros). Además, los reactivos de CRISPR FRESH son más económicos que los reactivos de RT-qPCR por reacción (Tabla Suplementaria 3). También demostramos su potencial para detectar ARN en cápsides intactas, un indicador de infectividad. Este informe proporciona una base para realizar ensayos de detección adicionales, rápidos y rentables en el campo de virus transmitidos por alimentos humanos en alimentos para controlar la propagación de brotes transmitidos por alimentos.

## **10. PERSPECTIVAS.**

Este estudio tuvo puntos fuertes y débiles. El primero fue que CRISPR FRESH aprovecha la precisión de Cas13a para lograr una detección cualitativa, sensible y específica del ARN viral, lo que proporciona un indicador confiable de la presencia de un objetivo. El segundo punto fuerte de este estudio fue la relación directa entre la concentración del ARN objetivo y la capacidad de detección de la enzima, lo que sienta las bases para un ensayo cuantitativo confiable. El tercer punto fuerte fue la evaluación de la recuperación y detección viral en diferentes tipos de productos agrícolas en múltiples dosis. Una limitación de este estudio fue que no pudimos comparar directamente los resultados de RT-qPCR con los resultados de CRISPR FRESH (por ejemplo, recuperación viral) dado que actualmente es cualitativo y aún no es capaz de cuantificarlo con precisión sin una optimización adicional. Una segunda limitación fue el requisito de una calibración exhaustiva, incluidas las comparaciones individuales de las pendientes determinadas por modelos de regresión lineal para concentraciones objetivo variables. Una tercera limitación puede ser la incapacidad metodológica para lograr una reducción del 100 % del ARN libre en las matrices de muestra (por ejemplo, diferentes tipos de productos), por lo que se necesitan nuevas metodologías para ajustar este factor de confusión.

Hay varias áreas de investigación futuras para aplicar este ensayo al norovirus humano en los alimentos. Una de ellas es permitir el análisis cuantitativo de patógenos en muestras de alimentos mediante la optimización de las concentraciones de cebadores y las condiciones de reacción para evitar los efectos de saturación (por ejemplo, en el paso de preamplificación) y estimar las proporciones de Cas13 activo con respecto al ARN objetivo. Una segunda área es desarrollar un flujo de trabajo de calibración que proporcione análisis paralelos confiables de concentraciones objetivo variables. Una tercera área es validar el método en diferentes matrices de alimentos para garantizar su precisión y confiabilidad, incluida la cuantificación de la eficiencia de elución viral para cada matriz de alimentos. Un objetivo a largo plazo sería integrar CRISPR FRESH en el conjunto de herramientas de detección existente de los profesionales de la seguridad alimentaria en la industria y el gobierno. Esto incluiría un análisis de costo-beneficio de su uso en comparación con los métodos de detección viral tradicionales.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aboubakr, H. A., Sampedro Parra, F., Collins, J., Bruggeman, P., & Goyal, S. M. (2020). In situ inactivation of human norovirus GII.4 by cold plasma: Ethidium monoazide (EMA)-coupled RT-qPCR underestimates virus reduction and fecal material suppresses inactivation. *Food Microbiology*, 85, 103307. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.103307>
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Ackerman, C. M., Myhrvold, C., Thakku, S. G., Freije, C. A., Metsky, H. C., Yang, D. K., Ye, S. H., Boehm, C. K., Kosoko-Thoroddsen, T. S. F., Kehe, J., Nguyen, T. G., Carter, A., Kulesa, A., Barnes, J. R., Dugan, V. G., Hung, D. T., Blainey, P. C., & Sabeti, P. C. (2020). Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*, 582(7811), 277–282. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2279-8>
- Adegoke, O., Seo, M. W., Kato, T., Kawahito, S., & Park, E. Y. (2016). An ultrasensitive SiO<sub>2</sub>-encapsulated alloyed CdZnSeS quantum dot-molecular beacon nanobiosensor for norovirus. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 135–142. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.06.027>
- Agrawal, A., Singh, S., Kolhapure, S., Hoet, B., Arankalle, V., & Mitra, M. (2019). Increasing Burden of Hepatitis A in Adolescents and Adults and the Need for Long-Term Protection: A Review from the Indian Subcontinent. In *Infectious Diseases and Therapy* (Vol. 8, Issue 4, pp. 483–497). Springer Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s40121-019-00270-9>
- Arizti-Sanz, J., Freije, C. A., Stanton, A. C., Petros, B. A., Boehm, C. K., Siddiqui, S., Shaw, B. M., Adams, G., Kosoko-Thoroddsen, T. S. F., Kembell, M. E., Uwanibe, J. N., Ajogbasile, F. V., Eromon, P. E., Gross, R., Wronka, L., Caviness, K., Hensley, L. E., Bergman, N. H., MacInnis, B. L., ... Myhrvold, C. (2020).

- Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19097-x>
- Ashiba, H., Sugiyama, Y., Wang, X., Shirato, H., Higo-Moriguchi, K., Taniguchi, K., Ohki, Y., & Fujimaki, M. (2017). Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance-assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 93, 260–266. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.08.099>
- Baek, S. H., Kim, M. W., Park, C. Y., Choi, C. S., Kailasa, S. K., Park, J. P., & Park, T. J. (2019). Development of a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of human norovirus via novel specific binding peptides. *Biosensors and Bioelectronics*, 123, 223–229. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.08.064>
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., & Uyttendaele, M. (2011a). Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013>
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., & Uyttendaele, M. (2011b). Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 151, Issue 3, pp. 261–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013>
- Barnes, K. G., Lachenauer, A. E., Nitido, A., Siddiqui, S., Gross, R., Beitzel, B., Siddle, K. J., Freije, C. A., Digheero-Kemp, B., Mehta, S. B., Carter, A., Uwanibe, J., Ajogbasile, F., Olumade, T., Odia, I., Sandi, J. D., Momoh, M., Metsky, H. C., Boehm, C. K., ... Sabeti, P. C. (2020). Deployable CRISPR-Cas13a diagnostic tools to detect and report Ebola and Lassa virus cases in real-time. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17994-9>
- Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Ozawa, S., Hall, A. J., & Lee, B. Y. (2016). Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>

- Bennett, S. D., Sodha, S. V., Ayers, T. L., Lynch, M. F., Gould, L. H., & Tauxe, R. V. (2018). Produce-associated foodborne disease outbreaks, USA, 1998-2013. *Epidemiology and Infection*, 146(11), 1397–1406.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268818001620>
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., & Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110–128. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.06.001>
- Bozkurt, H., Phan-Thien, K. Y., van Ogtrop, F., Bell, T., & McConchie, R. (2021). Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis a virus contamination in berries: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 116–138. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1719383>
- Cannon, J. L., Bonifacio, J., Bucardo, F., Buesa, J., Bruggink, L., Chi-Wai Chan, M., Fumian, T. M., Giri, S., Gonzalez, M. D., Hewitt, J., Lin, J. H., Mans, J., Muñoz, C., Pan, C. Y., Pang, X. L., Pietsch, C., Rahman, M., Sakon, N., Selvarangan, R., ... Vinjé, J. (2021). Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 27(5), 1438–1445. <https://doi.org/10.3201/EID2705.204756>
- Cannon, J. L., & Vinjé, J. (2008). Histo-blood group antigen assay for detecting noroviruses in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6818–6819. <https://doi.org/10.1128/AEM.01302-08>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Carvalho, C., Thomas, H. L., Balogun, K., Tedder, R., Pebody, R., Ramsay, M., & Ngui, S. L. (2012). A possible outbreak of hepatitis a associated with semidried tomatoes, England, July-November 2011. *Eurosurveillance*, 17(6), 20083. <https://doi.org/10.2807/ese.17.06.20083-en>
- CDC. (2024). *Norovirus Facts and Stats* | *Norovirus* | CDC. [https://www.cdc.gov/norovirus/data-research/?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/norovirus/burden.html](https://www.cdc.gov/norovirus/data-research/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/norovirus/burden.html)

- Ceylan, Z., Meral, R., & Cetinkaya, T. (2020). Relevance of SARS-CoV-2 in food safety and food hygiene: potential preventive measures, suggestions and nanotechnological approaches. In *VirusDisease* (Vol. 31, Issue 2, pp. 154–160). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13337-020-00611-0>
- Chan, M. C. W., Kwan, H. S., & Chan, P. K. S. (2017). Structure and Genotypes of Noroviruses. *The Norovirus*, 51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804177-2.00004-X>
- Chatziprodromidou, I. P., Bellou, M., Vantarakis, G., & Vantarakis, A. (2018). Viral outbreaks linked to fresh produce consumption: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 124(4), 932–942. <https://doi.org/10.1111/jam.13747>
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C. W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, 100(10), 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001318/CITE/REFWORKS>
- Cook, N., Williams, L., & D’Agostino, M. (2019). Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 79, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.003>
- Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2006). 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 and Environmental Microbiology*, 72(6), 3846–3855. <https://doi.org/10.1128/AEM.02660-05>
- Costantini, V., Morantz, E. K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X. L., Atmar, R. L., Estes, M. K., & Vinjé, J. (2018). Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1453. <https://doi.org/10.3201/EID2408.180126>
- Da, M. T., Felício, S., Hald, T., Liebana, E., Allende, A., Hugas, M., Nguyen-The, C., Skoien Johannessen, G., Niskanen, T., Uyttendaele, M., & Mclauchlin, J. (2014).

*Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: Initial evaluation using outbreak data (2007-2011).*

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.005>

Dancho, B. A., Chen, H., & Kingsley, D. H. (2012). Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 222–226.

<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.02.010>

Desbois, D., Couturier, E., Mackiewicz, V., Graube, A., Letort, M. J., Dussaix, E., & Roque-Afonso, A. M. (2010a). Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3306–3315. <https://doi.org/10.1128/JCM.00667-10>,

Desbois, D., Couturier, E., Mackiewicz, V., Graube, A., Letort, M. J., Dussaix, E., & Roque-Afonso, A. M. (2010b). Epidemiology and Genetic Characterization of Hepatitis A Virus Genotype IIA. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3306. <https://doi.org/10.1128/JCM.00667-10>

Elmahdy, E. M., Shaheen, M. N. F., Mahmoud, L. H. I., Hammad, I. A., & Soliman, E. R. S. (2022). Detection of Norovirus and Hepatitis A Virus in Strawberry and Green Leafy Vegetables by Using RT-qPCR in Egypt. *Food and Environmental Virology*, 14(2), 178–189. <https://doi.org/10.1007/S12560-022-09516-1/METRICS>

Escudero-Abarca, B. I., Rawsthorne, H., Goulter, R. M., Suh, S. H., & Jaykus, L. A. (2014). Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiology*, 41, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.009>

Eshaghi Gorji, M., Tan, M. T. H., Zhao, M. Y., & Li, D. (2021). No clinical symptom experienced after consumption of berry fruits with positive rt-qpcr signals of human norovirus. *Pathogens*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10070846>,

Fiore, A. E. (2004). Hepatitis A transmitted by food. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 38, Issue 5, pp. 705–715). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1086/381671>

Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y., & Miyazaki, K. (2006). Rapid

detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1376–1381. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1376-1381.2006/ASSET/C9578725-7CE9-4314-A382-8CE3149BDC59/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0040663410003.JPEG>

- Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A. M., Couturier, E., Carrillo-Santisteve, P., Pouey, J., Letort, M. J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S., de Valk, H., & Vaillant, V. (2011). Hepatitis a associated with semidried tomatoes, France, 2010. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 17, Issue 3, pp. 566–567). Emerg Infect Dis. <https://doi.org/10.3201/eid1703.101479>
- Gao, J., Xue, L., Li, Y., Zhang, J., Dai, J., Ye, Q., Wu, S., Gu, Q., Zhang, Y., Wei, X., & Wu, Q. (2024). A systematic review and meta-analysis indicates a high risk of human noroviruses contamination in vegetable worldwide, with GI being the predominant genogroup. *International Journal of Food Microbiology*, 413, 110603. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2024.110603>
- Gao, X., Wang, Z., Wang, Y., Liu, Z., Guan, X., Ma, Y., Zhou, H., Jiang, Y., Cui, W., Wang, L., & Xu, Y. (2019). Surveillance of norovirus contamination in commercial fresh/frozen berries from Heilongjiang Province, China, using a TaqMan real-time RT-PCR assay. *Food Microbiology*, 82, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.017>
- Gentry, J., Vinjé, J., Guadagnoli, D., & Lipp, E. K. (2009). Norovirus distribution within an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5474–5480. <https://doi.org/10.1128/AEM.00111-09>
- Gholizadeh, O., Akbarzadeh, S., Ghazanfari Hashemi, M., Gholami, M., Amini, P., Yekanipour, Z., Tabatabaie, R., Yasamineh, S., Hosseini, P., & Poortahmasebi, V. (2023). Hepatitis A: Viral Structure, Classification, Life Cycle, Clinical Symptoms, Diagnosis Error, and Vaccination. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Médicale*, 2023, 4263309. <https://doi.org/10.1155/2023/4263309>
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F.

- (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science*, 360(6387), 439–444.  
<https://doi.org/10.1126/science.aag0179>
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442.  
<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
- Grabow, W. O. K. (1997). Hepatitis viruses in water: Update on risk and control. *Water S.A.*, 23(4), 379–386.
- Greene, S. R., Moe, C. L., Jaykus, L. A., Cronin, M., Grosso, L., & Van Aarle, P. (2003). Evaluation of the NucliSens® Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 108(1), 123–131.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00286-0)
- Gronowski, A. M. (2018). Who or what is SHERLOCK? *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 29(3), 201–204. /pmc/articles/PMC6247122/
- Guo, Z., Huang, J., Shi, G., Su, C. hao, & Niu, J. J. (2014). A food-borne outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII in a university located in Xiamen City, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 28, 101–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.06.022>
- Hall, A. J., Eisenbart, V. G., Etingüe, A. L., Gould, L. H., Lopman, B. A., & Parashar, U. D. (2012). Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 18(10), 1566–1573.  
<https://doi.org/10.3201/eid1810.120833>
- Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.08.031>
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet,

- N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleesschauwer, B., Adegoke, G. O., Afshari, R., Alasfoor, D., ... Zeilmaker, M. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1001923>,
- Hewitt, J., Rivera-Aban, M., & Greening, G. E. (2009). Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 65–71.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04179.x>
- Hwang, H. J., Ryu, M. Y., Park, C. Y., Ahn, J., Park, H. G., Choi, C., Ha, S. Do, Park, T. J., & Park, J. P. (2017). High sensitive and selective electrochemical biosensor: Label-free detection of human norovirus using affinity peptide as molecular binder. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 164–170.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.08.031>
- Jeon, S. B., Seo, D. J., Oh, H., Kingsley, D. H., & Choi, C. (2017). Development of one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for norovirus detection in oysters. *Food Control*, 73, 1002–1009.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.10.005>
- Justino, C. I. L., Freitas, A. C., Pereira, R., Duarte, A. C., & Rocha Santos, T. A. P. (2015). Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 68, 2–17.  
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.03.006>
- Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols*, 14(10), 2986–3012. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>
- Kim, S. Y., & Ko, G. (2012). Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Letters in Applied Microbiology*, 55(3), 182–188. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2012.03276.X>

- Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., & Jaykus, L. A. (2013). A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 295–309.  
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709820>
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C.-H., Vinjé, J., de Medici, D., & Monroe, S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 187–205.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00610.x>
- Kostela, J., Ayers, M., Nishikawa, J., McIntyre, L., Petric, M., & Tellier, R. (2008). Amplification by long RT-PCR of near full-length norovirus genomes. *Journal of Virological Methods*, 149(2), 226–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.001>
- Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E., & Jean, J. (2008). Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3349–3355. <https://doi.org/10.1128/AEM.02878-07/ASSET/258A2166-6D61-40C7-8801-7F4D93F57DE3/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0110888810005.JPEG>
- Lane, D., Husemann, E., Holland, D., & Khaled, A. (2019). Understanding foodborne transmission mechanisms for Norovirus: A study for the UK's Food Standards Agency. *European Journal of Operational Research*, 275(2), 721–736.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejor.2018.11.070>
- Le Guyader, F. S., Le Saux, J. C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., & Atmar, R. L. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 4011–4017. <https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>
- Lemon, S. M., Ott, J. J., Van Damme, P., & Shouval, D. (2018). Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *Journal of Hepatology*, 68(1), 167–184.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2017.08.034>,

- Li, D., Baert, L., Xia, M., Zhong, W., Van Coillie, E., Jiang, X., & Uyttendaele, M. (2012). Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. *Journal of Virological Methods*, 181(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2012.01.001>
- Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., LoBue, A. D., Cannon, J. L., Zheng, D. P., Vinje, J., & Baric, R. S. (2008). Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Medicine*, 5(2), e31. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0050031>
- Liu, L., & Moore, M. D. (2020a). A survey of analytical techniques for noroviruses. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/FOODS9030318>,
- Liu, L., & Moore, M. D. (2020b). A Survey of Analytical Techniques for Noroviruses. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/FOODS9030318>
- Luo, J., Xu, Z., Nie, K., Ding, X., Guan, L., Wang, J., Xian, Y., Wu, X., & Ma, X. (2014). Visual Detection of Norovirus Genogroup II by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification with Hydroxynaphthol Blue Dye. *Food and Environmental Virology*, 6(3), 196–201. <https://doi.org/10.1007/S12560-014-9142-8/TABLES/2>
- Makary, P., Maunula, L., Niskanen, T., Kuusi, M., Virtanen, M., Pajunen, S., Ollgren, J., & Tran Minh, N. N. (2009). Multiple norovirus outbreaks among workplace canteen users in Finland, July 2006. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 402–407. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000605>
- Manuel, C. S., Moore, M. D., & Jaykus, L. A. (2018). Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. *Food Microbiology*, 76, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.015>
- Marti, E., Ferrary-Américo, M., & Barardi, C. R. M. (2017). Detection of Potential Infectious Enteric Viruses in Fresh Produce by (RT)-qPCR Preceded by Nuclease Treatment. *Food and Environmental Virology*, 9(4), 444–452. <https://doi.org/10.1007/S12560-017-9300-X>
- Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkelä, S., Söderberg, K., Summa, M., von

- Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., & Niskanen, T. (2009). Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 14(49), 19435. <https://doi.org/10.2807/ese.14.49.19435-en>
- Monteiro, S., & Santos, R. (2018). Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: Implications for public health risk assessment. *Journal of Applied Microbiology*, 124(4), 965–976. <https://doi.org/10.1111/JAM.13568>
- Moore, M. D., Bobay, B. G., Mertens, B., & Jaykus, L.-A. (2016). Human Norovirus Aptamer Exhibits High Degree of Target Conformation-Dependent Binding Similar to That of Receptors and Discriminates Particle Functionality. *MSphere*, 1(6). [https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00298-16/SUPPL\\_FILE/SPH006162179SF5.PDF](https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00298-16/SUPPL_FILE/SPH006162179SF5.PDF)
- Moore, M. D., & Jaykus, L. A. (2017). Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Detection of Epidemic Human Noroviruses. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/SREP40244;TECHMETA=29,45,77,90;SUBJMETA=107,1647,2234,326,631;KWRD=CLINICAL+MICROBIOLOGY,MICROBIOLOGY+TECHNIQUES>
- Moreno, L., Aznar, R., & Sánchez, G. (2015). Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.012>
- Müller, A., Collineau, L., Stephan, R., Müller, A., & Stärk, K. D. C. (2017). Assessment of the risk of foodborne transmission and burden of hepatitis E in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.018>
- Müller, L., Schultz, A. C., Fonager, J., Jensen, T., Lisby, M., Hindsdal, K., Krusell, L., Eshøj, A., Møller, L. T., Porsbo, L. J., Böttiger, B. E., Kuhn, K., Engberg, J., &

- Ethelberg, S. (2015). Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010-2011. *Epidemiology and Infection*, 143(11), 2299–2307. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003409>
- Mustafa, M. I., & Makhawi, A. M. (2021). Sherlock and detectr: CRISPR-cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 59, Issue 3). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20>
- Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., ... Sabeti, P. C. (2018). Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 360(6387), 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of Virological Methods*, 104(2), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00089-7)
- Parra, G. I. (2019). Emergence of norovirus strains: A tale of two genes. *Virus Evolution*, 5(2). <https://doi.org/10.1093/VE/VEZ048>
- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: A comprehensive review. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 1–8). J Clin Virol. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
- Pecson, B. M., Martin, L. V., & Kohn, T. (2009). Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5544–5554. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-09>,
- Perrin, A., Loutreul, J., Boudaud, N., Bertrand, I., & Gantzer, C. (2015). Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. *Journal of Virological Methods*, 224, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.005>

- Petri, K., & Pattanayak, V. (2018). SHERLOCK and DETECTR Open a New Frontier in Molecular Diagnostics. *The CRISPR Journal*, 1(3), 209–211.  
<https://doi.org/10.1089/crispr.2018.29018.kpe>
- Petrignani, M., Harms, M., Verhoef, L., van Hunen, R., Swaan, C., van Steenberghe, J., Boxman, I., Sala, R. P. I., Ober, H. J., Vennema, H., Koopmans, M., & van Pelt, W. (2010). Update: A food-borne outbreak of hepatitis a in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *Eurosurveillance*, 15(20), 19572. <https://doi.org/10.2807/es.15.20.19572-en>
- Randazzo, W., López-Gálvez, F., Allende, A., Aznar, R., & Sánchez, G. (2016). Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 229, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.04.010>
- Randazzo, W., & Sánchez, G. (2020). Hepatitis A infections from food. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1120–1132. <https://doi.org/10.1111/JAM.14727>
- Raymond, P., Paul, S., & Guy, R. A. (2023). Impact of Capsid and Genomic Integrity Tests on Norovirus Extraction Recovery Rates. *Foods*, 12(4).  
<https://doi.org/10.3390/FOODS12040826/S1>
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015a). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015b). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14/ASSET/229E800D-B839-4C2D-86AD-7D07A9DABBD1/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924950002.JPEG>
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M. S. J., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J. C., Rzezutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C. H., de Roda Husman, A. M., ... van der Poel, W. H. M. (2012). Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 786. <https://doi.org/10.1111/J.1574->

- Ryu, H., Schrantz, K. A., Brinkman, N. E., & Boczek, L. A. (2018). Applicability of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC-RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies. *Journal of Virological Methods*, 258, 35–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.05.008>
- Sánchez, G., Elizaquível, P., & Aznar, R. (2012). Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food and Environmental Virology*, 4(1), 21–25. <https://doi.org/10.1007/S12560-011-9074-5/TABLES/3>
- Saylan, Y., Erdem, Ö., Ünal, S., & Denizli, A. (2019). An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. *Biosensors 2019, Vol. 9, Page 65*, 9(2), 65. <https://doi.org/10.3390/BIOS9020065>
- Seo, K., Lee, J. E., Lim, M. Y., & Ko, G. (2012). Effect of Temperature, pH, and NaCl on the Inactivation Kinetics of Murine Norovirus. *Journal of Food Protection*, 75(3), 533–540. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-199>
- Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B. R., Faber, M., Sundqvist, L., Rimhanen-Finne, R., Roque-Afonso, A. M., Ngui, S. L., Allerberger, F., Baumann-Popczyk, A., Muller, L., Parmakova, K., Alfonsi, V., Tavoschi, L., Vennema, H., Fitzgerald, M., Myrmel, M., Gertler, M., ... Rizzo, C. (2015). Large and prolonged food-borne multistate hepatitis a outbreak in europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, 20(29).  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.29.21192>
- Shah, N., Faridi, M. M. A., Mitra, M., Bavdekar, A., Karadkhele, A., Puppallwar, G., & Jain, R. (2020). Review of long term immunogenicity and tolerability of live hepatitis A vaccine. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 16, Issue 11, pp. 2816–2821). Bellwether Publishing, Ltd.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1741997>
- Shukla, S., Cho, H., Kwon, O. J., Chung, S. H., & Kim, M. (2018). Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: Risk to human

- health—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 405–419.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1182891>
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., & Uyttendaele, M. (2012). Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 153, Issues 1–2, pp. 1–9). Int J Food Microbiol.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.014>
- Tan, M. T. H., Gong, Z., & Li, D. (2023). Use of Zebrafish Embryos To Reproduce Human Norovirus and To Evaluate Human Norovirus Infectivity Decay after UV Treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(4).  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00115-23>,
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
- Tian, P., Yang, D., Shan, L., Wang, D., Li, Q., Gorski, L., Lee, B. G., Quiñones, B., & Cooley, M. B. (2017). Concurrent Detection of Human Norovirus and Bacterial Pathogens in Water Samples from an Agricultural Region in Central California Coast. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1560.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01560>
- Torok, V. A., Hodgson, K. R., Jolley, J., Turnbull, A., & McLeod, C. (2019). Estimating risk associated with human norovirus and hepatitis A virus in fresh Australian leafy greens and berries at retail. *International Journal of Food Microbiology*, 309.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108327>
- Trudel-Ferland, M., Levasseur, M., Goulet-Beaulieu, V., Jubinville, E., Hamon, F., & Jean, J. (2024). Concentration of foodborne viruses eluted from fresh and frozen produce: Applicability of ultrafiltration. *International Journal of Food Microbiology*, 416, 110687.

<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2024.110687>

Velebit, B., Djordjevic, V., Milojevic, L., Babic, M., Grkovic, N., Jankovic, V., & Yushina, Y. (2019). The common foodborne viruses: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 333(1), 012110.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012110>

Vo-Dinh, T., & Cullum, B. (2000). Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), 540–551. <https://doi.org/10.1007/S002160051549/METRICS>

WHO. (2018). *Microbiological risk assessment series. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables*. Geneva: WHO.

<https://www.who.int/publications/i/item/9789241563789>

Yekta, R., Vahid-Dastjerdi, L., Norouzbeigi, S., & Mortazavian, A. M. (2021). Food products as potential carriers of SARS-CoV-2. In *Food Control* (Vol. 123, p. 107754). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107754>

Yezli, S., & Otter, J. A. (2011). Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food and Environmental Virology*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S12560-011-9056-7>

Yu, J. H., Kim, N. Y., Koh, Y. J., & Lee, H. J. (2010). Epidemiology of foodborne norovirus outbreak in incheon, Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 25(8), 1128–1133. <https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.8.1128>

Zhou, J., Yin, L., Dong, Y., Peng, L., Liu, G., Man, S., & Ma, L. (2020). CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: Sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples. *Analytica Chimica Acta*, 1127, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.041>