

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES INFECCIOSAS DE NOROVIRUS  
MURINO POR RT-qPCR, CRISPR-Cas13a Y TCID<sub>50</sub> POSTERIOR A  
PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON ARNasa.

Por

BRENDA YAMILLE CERINO HERNÁNDEZ

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

2026

CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES INFECCIOSAS DE NOROVIRUS  
MURINO POR RT-qPCR, CRISPR-Cas13a Y TCID<sub>50</sub> POSTERIOR A  
PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON ARNasa.

Comité de Tesis



**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
Director de Tesis



**Dra. Yaraymi Ortiz Reyes**  
Secretario



**Dr. José Santos García Alvarado**  
Vocal



**Dr. José Ángel Merino Mascorro**  
Vocal



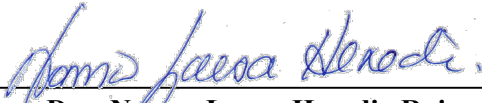
**Dr. Eduardo Franco Frías**  
Vocal



**Dra. Katiushka Arevalo Niño**  
Subdirección  
DE POSGRADO  
Subdirector de Posgrado

CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES INFECCIOSAS DE NOROVIRUS  
MURINO POR RT-qPCR, CRISPR-Cas13a Y TCID<sub>50</sub> POSTERIOR A  
PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON ARNasa.

**Comité de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
Director de Tesis

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

A la Dra. Norma Heredia y al Dr. Santos García, por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio y conocer una nueva área de investigación. Admiración total a su dedicación y forma de trabajo.

A Axel, por ser un inesperado gran amiguito que me ha enseñado y ha cubierto cada una de mis dudas hablando y hablando, adaptándonos muy bien para chambear. Así como también por tener una extraña, dudable y ENORME confianza en mí. Gracias por adoptarme durante +2 años, hiciste definitivamente demasiado divertida la maestría.

A Eli, Caro, Mauricio y a la Dra. Yara, que definitivamente son muy buenas personas y los estimo mucho, con ellos pasé demasiadas situaciones divertidas y reflexivas durante estos años. Deseo cumplan todo lo que se propongan en la vida que para mí son lo máximo.

A Elías, por estar activo emocional y físicamente a pesar de todo, manteniendo la planeación e innovación en esto que hay. También a Fátima, Mariana y Pato quienes mantuvieron los tiempos y salidas con demasiada información y experiencias.

A Leonor y Sigfrid, por llorar juntitos durante nuestras maestrías y prometernos una vida de ensueño cada que salíamos a despejarnos a pesar de nuestras ocupadas agendas.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnologías e Innovación (SECIHTI) por el apoyo financiero otorgado durante todo mi periodo académico.

Gracias:)

## DEDICATORIA

A Rubén y Esteban,  
por darme de su *felicidad, esperanza y conocimientos*.  
*Sin ustedes yo no sería, gracias eternas, Bx:).*

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>ÍNDICE</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	10
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1 Generalidades de norovirus .....	17
2.1.1 Hospederos. ....	18
2.1.1.1 Humanos. ....	18
2.1.1.2 Animales no humanos.....	19
2.1.2 Virus subrogados .....	19
2.1.2.1 Calicivirus felino (FCV).....	20
2.1.2.2 Norovirus murino (MNV-1).....	20
2.1.2.3 Colifago MS2 (MS2).....	21
2.1.2.4 Virus de Tulane (TV).....	21
2.2 Factores de riesgo. ....	22
2.2.1 Edad.....	22
2.2.2 Interacción con microbiota intestinal. ....	22
2.2.3 Condiciones ambientales. ....	23
2.3 Transmisión .....	23
2.4 Epidemiología.....	24
2.4.1 Internacional.....	24
2.4.2 México.....	25
2.5 Métodos de detección del norovirus. ....	26
2.5.1 Detección en el área clínica. ....	26
2.5.1.1 Métodos moleculares.....	26
2.5.1.2 Métodos inmunológicos. ....	27
2.5.1.3 Sistemas automatizados.....	27
2.5.2 Detección ambiental y alimentos.....	27

2.5.2.1	Métodos moleculares.....	27
2.5.2.2	Biosensores.....	28
2.5.2.3	CRISPR-Cas.....	28
2.5.3	Integridad de la cápside. ....	29
2.6	Tratamiento.....	30
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
6.1	Mantenimiento de línea celular.....	34
6.2	Propagación viral de MNV-1.....	34
6.3	Titulación de partículas virales por RT-qPCR.....	34
6.4	Pretratamiento con ARNasa.....	35
6.5	Extracción ARN viral .....	36
6.6	Detección por TCID <sub>50</sub> .....	36
6.7	Estandarización y detección por CRISPR-Cas13a. ....	37
6.7.1	Amplificación isotérmica de la polimerasa recombinasa (RT-RPA). ....	37
6.7.2	Detección por CRISPR-Cas13a.....	38
6.8	Análisis estadístico. ....	38
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
7.1	Cuantificación por RT-qPCR y características del inóculo.....	39
7.2	Cuantificación por TCID <sub>50</sub> . ....	40
7.3	Cuantificación, sensibilidad (LOD), y especificidad por CRISPR Cas13a.....	40
7.4	Estandarización del ensayo de pre-tratamiento con ARNasa. ....	42
7.5	Cuantificación de MNV-1 pre-expuesto a temperaturas de -20, 5 y 80 °C y pre-tratado con ARNasa por medio de TCID <sub>50</sub> , RT-qPCR y CRISPR-Cas13a. ....	42
7.6	Impacto de la temperatura en el título viral de MNV-1.....	46
7.7	Relación de linealidad en la detección de partículas infectivas entre TCID <sub>50</sub> y técnicas moleculares.....	48
7.8	Equivalencia de detección entre TCID <sub>50</sub> y técnicas moleculares de partículas infectivas 50	
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.-	Oligonucleótidos y sonda para cuantificación de MNV-1.	35
2.-	Fórmulas para cálculos de títulos virales por TCID <sub>50</sub> .	37
3.-	Secuencias utilizadas para detección de MNV-1 mediante CRISPR-Cas13a.	38
4.-	Reducción de ARN posterior a un pretratamiento con ARNasa.	42
5.-	Cuantificación de MNV-1 por TCID <sub>50</sub> , RT-qPCR y CRISPR-Cas13a antes y después del pretratamiento enzimático con ARNasa y tratamiento térmico.	45
6.-	Diferencias estadísticas entre TCID <sub>50</sub> , RT-qPCR y CRISPR-Cas13a tratados bajo condiciones térmicas	46
7.-	Relación entre TCID <sub>50</sub> -RT-qPCR-CRISPR-Cas13a por radios de equivalencia.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.-	Curva estándar de detección de MNV-1 por RT-qPCR.	39
2.-	Límites de detección de CRISPR-Cas13a con MNV-1.	41
3.-	Ensayo de sensibilidad con diferentes blancos usando el guía diseñado para MNV-1.	41
4.-	Diferencia en comparación del control (37 °C) entre valores obtenidos en los diferentes tratamientos térmicos sin ARNasa A) en TCID <sub>50</sub> , B) en RT-qPCR y C) en CRISPR-Cas13a.	47
5.-	Diferencia en comparación del control (37 °C) entre valores obtenidos en los diferentes tratamientos térmicos sin tratamiento con ARNasa A) en TCID <sub>50</sub> , B) en RT-qPCR y C) en CRISPR-Cas13a.	48
6.-	Análisis de correlación de Spearman para las técnicas de TCID <sub>50</sub> y RT-qPCR en los diferentes tratamientos térmicos.	49
7.-	Análisis de correlación de Spearman para las técnicas de TCID <sub>50</sub> y CRISPR-Cas13a en los diferentes tratamientos térmicos.	50

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ETAs	Enfermedades de transmisión por alimentos
°C	Grados centígrados
>	Mayor que
<	Menor que
≥	Mayor o igual que
h	Hora
%	Porcentaje
T°	Tratamiento térmico
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (del inglés, reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction,)
TCID <sub>50</sub>	Dosis infecciosa del 50 % en cultivo de tejidos (del inglés, 50% tissue culture infectious dose)
CRISPR-Cas	Sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés, clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
ARN	Ácido ribonucleico
HuNoV/NoV	Norovirus humano / Norovirus
MNV-1	Norovirus murino
GI-GIX	Genogrupo I - IX
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés, open reading frame)
CDC	Centro de control de enfermedades (del inglés, Centers for Disease Control)
µg/ml	microgramo por mililitro
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfónico
RAW 264.7	Línea celular derivada de un tumor de ratón inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés, multiplicity of infection)
RPM	Revoluciones por minuto
min	Minuto
µg	Microgramo
U	Unidades de enzima
dNTP	Desoxirribonucleótidos
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, phosphate buffered saline)

x g	Fuerza relativa de centrifuga
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
Log <sub>10</sub> cg/ml	Logaritmo de copias genómicas por mililitro
Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml	Logaritmo de TCID <sub>50</sub> /ml
gARN	ARN guía
μM	Micro molar
BSA	Albúmina sérica bovina
rNTP	Ribonucleótido trifosfato
U/μl	Unidades por microlitro
mM	Milimolar
Ct	Ciclo de amplificación
cg/rxn	Copias genómicas por reacción
RFU (a.u)	Unidades relativas de fluorescencia (unidades arbitrarias)
HAV	Virus de hepatitis A
r	Coefficiente de correlación r
(+)	Técnica tratada con enzima ARNasa
(-)	Técnica sin tratamiento con ARNasa

## RESUMEN

En la actualidad, la detección de norovirus, virus responsable del 58% de los brotes epidemiológicos a nivel mundial, se realiza principalmente mediante RT-qPCR en muestras de aguas y alimentos establecidos en normativa internacional (ISO 15216-1:2019). Debido a su difícil implementación en la industria, se ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías que cubran las limitaciones, así como su costo económico. Además, la incapacidad de esta tecnología para distinguir entre partículas virales infecciosas de las no infecciosas (ARN libre o expuesto) ha conllevado a la implementación de pretratamientos con enzimas tales como la ARNasa para eliminar el ARN que pueda dar un falso positivo. Por esta razón, en el presente trabajo se buscó detectar las partículas virales infectivas (de cápside intacta) posterior a inactivar el virus MNV-1 (usado como subrogado del HuNoV) en concentraciones de  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$  cg/rxn, mediante la exposición a tratamientos térmicos ( $-20$  °C,  $5$  °C,  $37$  °C,  $80$  °C). Después mediante la aplicación de 20 U de ARNasa, se detectó el virus comparando entre el método celular de TCID<sub>50</sub>, la metodología estándar RT-qPCR y la técnica innovadora CRISPR-Cas13a, con el fin de establecer correlaciones entre técnicas y abolir las limitantes del método actual establecido en la detección de virus intactos. El MNV-1 se tituló mediante TCID<sub>50</sub>. Para las técnicas moleculares se realizó extracción de ARN, en el caso de RT-qPCR se sintetizó ADNc mientras que con CRISPR-Cas13a se realizó RT-RPA y amplificación T7 para realizar la titulación del virus. Ambas técnicas moleculares no mostraron reactividad cruzada con otros virus entéricos. La RT-qPCR (LOD 10 cg) mostró mayor sensibilidad que CRISPR-Cas13a (LOD  $1.08 \times 10^4$  cg). Las técnicas moleculares mostraron mayor detección de MNV-1 que TCID<sub>50</sub>. La mayor inactivación de MNV-1 se observó en las tratadas a  $80$  °C seguido de las tratadas a  $-20$  °C. Al comparar la linealidad de los datos obtenidos, TCID<sub>50</sub> y RT-qPCR mostraron altos coeficientes ( $r = >0.715$ ) de correlación mientras que TCID<sub>50</sub> y CRISPR-Cas13a únicamente a  $5$  °C mostró buen coeficiente de correlación ( $r = <0.929$ ). No se encontró buena linealidad entre los datos de ambas técnicas moleculares ( $r = <0.606$ ). A pesar de esto, se encontraron equivalencias entre las técnicas TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR, TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a y CRISPR-Cas13a:TCID<sub>50</sub>. En el presente proyecto, la RT-qPCR mostró ser la técnica con mejores concordancias a comparación de TCID<sub>50</sub> cuando se refiere a la presencia de partículas virales infectivas y a CRISPR-Cas13a cuando se trata con ARNasa.

## ABSTRACT

Currently, norovirus detection, which is responsible for 58% of epidemiological outbreaks worldwide, is primarily determined by RT-qPCR analysis of water and food samples, as established in international standards (ISO 15216-1:2019). Due to its difficulty of implementation in industry, the development of new technologies has been promoted to overcome its limitations and economic costs. Additionally, the inability of this technology to distinguish between infectious and non-infectious viral particles (free or exposed RNA) has led to the implementation of pretreatments with enzymes, such as RNase, to eliminate RNA that could produce a false positive result. For this reason, the present study aimed to detect infectious viral particles with intact capsids after inactivating the MNV-1 virus (used as surrogate for HuNoV) at concentrations of  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$ , and  $10^0$  cg/rxn, through exposure to heat treatments (-20 °C, 5 °C, 37 °C, 80 °C). Then 20 U of RNase were applied and the viruses were detected by comparing the TCID<sub>50</sub> cellular method, the standard RT-qPCR method, and the innovative CRISPR-Cas13a technique. With the purpose of establishing correlations between techniques and eliminate the limitations when using the current established method for detecting intact viruses. MNV-1 was titrated using TCID<sub>50</sub>. For the molecular techniques, RNA extractions was performed and in the case of RT-qPCR, cDNA was synthesized while with CRISPR-Cas13a, RT-RPA and T7 amplification were performed to titrate the virus. Cross-reactivity with enteric viruses was not shown by both molecular techniques. Furthermore, greater sensitivity was shown by RT-qPCR (LOD 10 cg) than by CRISPR-Cas13a (LOD  $1.08 \times 10^4$  cg). The use of molecular techniques resulted in a higher detection rate of MNV-1 compared to the TCID<sub>50</sub> method. The biggest decrease in MNV-1 samples was seen in those treated at 80°C, followed by those treated at -20 °C. When we compared the linearity of the data obtained, TCID<sub>50</sub> and RT-qPCR showed high correlation coefficients ( $r = >0.715$ ), while TCID<sub>50</sub> and CRISPR-Cas13a only at 5°C showed good correlation coefficients ( $r = <0.929$ ). There was no significant linearity between the data from the two molecular techniques ( $r = <0.606$ ). Despite this, equivalence (ratios) were found between the TCID<sub>50</sub>:RT-qPCR, TCID<sub>50</sub>:CRISPR-Cas13a, and CRISPR-Cas13a:TCID<sub>50</sub> techniques. In conclusion, RT-qPCR proved to be the technique with the best concordance in comparison to TCID<sub>50</sub> referring to the presence of infectious viral particles and to CRISPR-Cas13a when treated with RNase.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son actualmente una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial. Los agentes patógenos responsables de estas enfermedades gastrointestinales son principalmente de origen viral, seguido de bacterias y parásitos que contaminan una amplia variedad de alimentos (Alidjinou *et al.*, 2018). Una vía importante de contaminación es el contacto con heces o secreciones de animales, que contaminan frutas y verduras a través del riego con aguas contaminadas (Painter *et al.*, 2013).

Los brotes registrados en los últimos años indican que anualmente de cada 600 millones de personas que enferman de gastroenteritis aguda, alrededor de 81% de ellas necesitan hospitalización y, de estos últimos, el 0.04% fallecen (Kotsiri *et al.*, 2022; Hall *et al.*, 2013). Las autoridades responsables de la inocuidad en los alimentos reportan que estos brotes son causados principalmente por contaminación con bacterias como *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, y *E. coli* productora de toxina Shiga, o por virus como rotavirus, virus de hepatitis A y E, así como norovirus. Estos últimos encabezan la lista de patógenos que provocan visitas al hospital, sobre todo en niños menores a 5 años (Stals *et al.*, 2012; Painter *et al.*, 2013).

En la actualidad, se ha identificado al norovirus humano como el principal responsable de brotes gastrointestinales de etiología única debido a su fácil transmisión vía fecal-oral a través de fomites, aguas o aerosoles (Murata *et al.*, 2007). Aunque estos no dependen de la ruta de los alimentos para ser transmitidos, son el vehículo más común debido a que es probable que dicha contaminación provenga de la manipulación directa por parte de personas infectadas que forman parte de la cadena de producción (Canales *et al.*, 2019). Por lo tanto, la detección y prevención del norovirus humano (HuNoV) se convierte en un punto relevante con el fin de evitar su propagación causando brotes a grandes escalas (Duret *et al.*, 2017).

Una característica de la mayoría de los virus gastrointestinales es su gran estabilidad en el ambiente; en el caso de norovirus, suelen ser altamente resistentes a condiciones adversas como altas temperaturas (>60 °C) y desinfectantes comunes (hipoclorito de sodio, etanol), permitiéndole una persistencia en superficies de hasta 2 a 4 semanas (Murata *et al.*, 2007). También poseen alta diseminación de partículas virales al encontrarse hasta en 10<sup>10</sup>/g de

heces y alta capacidad de infección al tener dosis infectivas bajas ( $\geq 10$  partículas virales) y; Teunis *et al.*, 2015). Adicionalmente, las infecciones asintomáticas y la carga viral persistente en individuos infectados antes y después de las manifestaciones sintomáticas (desde 2 h antes hasta >4 meses después del cuadro sintomático) hace que los virus sean difíciles de controlar (Qiu *et al.*, 2023). Por esto, la alarma global de las autoridades de inocuidad alimentaria sigue en pie (Elviss *et al.*, 2022).

En países desarrollados se trabaja en sistemas de vigilancia, monitoreo y detección que sean rápidos y sensibles con el objetivo de aplicarlos de forma inmediata tanto en la industria alimentaria como en la clínica (Elviss *et al.*, 2022). Lo anterior debido a que la técnica estándar aprobada por la FDA es la RT-qPCR para muestras clínicas, de alimentos, aguas y muestras ambientales, sin embargo, se han modificado continuamente las condiciones pre y post análisis para evitar resultados erróneos, así como tratar de detectar simultáneamente diversas cepas (Vinje, 2015).

No obstante, las técnicas de detección se encuentran tratando de separar los conceptos de “copias virales” con “infectividad viral”, que son aspectos relevantes a la hora de realizar pruebas y declarar positivos con norovirus los lotes de alimentos (Manuel *et al.*, 2018). En general, los sistemas aprobados por organismos normativos difieren en sensibilidad y especificidad, causado por la variabilidad antigénica y por la deriva genética entre cepas, además de no diferenciar entre partículas virales infecciosas y no infecciosas (Pouillot *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2014).

A causa de esto, proponemos en el presente trabajo estandarizar y desarrollar un método cuantitativo de partículas virales infecciosas para discriminar de aquellas no infecciosas mediante un pretratamiento enzimático con ARNasa mediante CRISPRd-Cas13a y compararlo con la técnica celular de infectividad TCID<sub>50</sub> y el estándar RT-qPCR

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de norovirus

El norovirus humano, anteriormente conocido como virus similar a Norwalk, es un virus no envuelto perteneciente a uno de los cinco géneros de la familia *Caliciviridae*. Este se caracteriza por tener una forma asimétrica icosaédrica de 27 a 40 nm de diámetro. El virus tiene un genoma de ARN poliadenilado monocatenario de polaridad positiva con una longitud de  $\approx 7.7$  Kb. Este se divide en tres marcos de lectura abiertos (ORF-1, ORF-2 y ORF-3), los cuales codifican para las diversas proteínas virales (Ryu *et al.*, 2014).

El ORF-1 presenta una secuencia codificadora para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Además, codifica una poliproteína que se procesa de forma postraduccional por una proteasa viral permitiendo la formación de 6 proteínas no estructurales (NS1/2 a NS7; Robiloti *et al.*, 2015; Lucero *et al.*, 2021).

Aunque los ORF-2 y ORF-3 son responsables de codificar los componentes estructurales del virón; en particular el ORF-2 codifica para la proteína estructural principal VP1 que presenta dos dominios. El dominio Shell (S) que forma una “cáscara” alrededor del genoma viral, y Postruding (P) que se divide en los subdominios P1 y P2. Este último presenta los sitios de unión a receptores celulares (epítomos; Allen y Harris, 2017), sin embargo, ambos son responsables de la disposición estructural en forma de “copa” del virus. ORF-3 codifica para la proteína estructural menor VP2, la cual se sugiere que participa en el ensamblaje de la cápside y encapsidación del genoma (Smith *et al.*, 2019).

Este virus, al igual que otros virus de ARN, posee un alto nivel de diversidad genética que ha llevado a reconocer la subdivisión en 10 genogrupos (GI – GX), subdivididos a su vez en genotipos (Ryu *et al.*, 2014). Esta clasificación se basa en la diversidad de aminoácidos de la cápside VP1, así como en la región codificadora de la RdRp llamada NS7, reportándose a causa de esta región variabilidad de más de 49 genotipos. En contraste, según datos de los Centros de Control de Enfermedades (del inglés, CDC) los análisis realizados mediante la RdRp dividen este virus en más de 60 genotipos (Cannon *et al.*, 2021). La identificación dual de VP1-RdRp, actualmente rutinaria, clasifica secuencias ya conocidas y aquellas con falta de secuenciación dentro de los genogrupos ya establecidos, aumentando el tamaño y la diversidad de estos (Chhabra *et al.*, 2019; Kroneman *et al.*, 2013).

Por variedad genotípica, el genogrupo GII presenta la mayor diversidad de cepas (27/49), seguida del genogrupo GI (9/49) y el GIII (3/49). Además, GIV, GV y GVI presentan 2 genotipos dejando únicamente 1 genotipo para cada uno de los genogrupos GVII, GVIII, GVIX y GX (Bai *et al.*, 2023). Las cepas más distribuidas son las pertenecientes al GII, en especial GII.4 (Chhabra *et al.*, 2019). Actualmente, se habla de la aparición de GII.17 como responsables de gastroenteritis aguda que han ido desplazando lentamente a la GII.4 tal como ésta lo hizo con la cepa GII.3 (Cannon *et al.*, 2021). Se estima que las variantes antigénicas de la cápside de HuNoV se presentan cada 3 años causado por una tasa de  $10^{-2}$  sustituciones/sitio/año en la VP1 debido a errores en la codificación de la RdRp, por lo que las investigaciones de tratamiento necesitan constante actualización (Allen *et al.*, 2017).

No obstante, en la actualidad no se conoce cuál es el receptor primario en las células huésped del HuNoV; sin embargo, se ha caracterizado ampliamente la interacción de los epítomos del dominio P2 con los antígenos de los grupos histosanguíneos (HBGA; Allen y Harris, 2017). Estos glucanos, expresados en células epiteliales intestinales y secreciones mucosas, son catalizados por un conjunto de tres glicosil-transferasas codificadas por 3 familias de genes: Secretor, Lewis y ABO (genes *FUT2*, *FUT3* y dos glicosil-transferasas A y B respectivamente) los cuales se caracterizan por estar involucrados en la unión del HuNoV a las células blanco, así como en ausencia de estos, la resistencia a la replicación del virus (Bai *et al.*, 2023).

Cada cepa de HuNoV muestra diferencias de afinidad y antigenicidad al parátomo HBGA de las superficies celulares. En ese caso, entre más amplia sea la gama de epítomos que exprese una cepa, mayor será su capacidad de infectar a la población susceptible y desplazar a otros genotipos (Vinje, 2015; Parra *et al.*, 2017).

#### 2.1.1 Hospederos.

Debido a la gran diversidad de genotipos presente en los diez genogrupos en los que se clasifican los norovirus, estos logran infectar una gran diversidad de mamíferos los cuales distribuyen las partículas virales en fómites, alimentos y aguas (Parra *et al.*, 2017).

##### 2.1.1.1 Humanos.

Las infecciones en humanos se presentan como un cuadro de gastroenteritis aguda en el que la inflamación del estómago e intestinos causan dolor estomacal, diarrea y vómito

(Lucero *et al.*, 2021). La fase sintomática aguda es de 1 a 4 días con una diseminación viral de semanas, principalmente por cepas pertenecientes al genogrupo GI, GII y GIV. Según los CDC, la cepa GII.4 con su variante GII.4 Sydney y las GII.4 no genotificables han sido las más detectadas, así como también cepas GII.2, GII.3 y GII.6 (Cannon *et al.*, 2021).

#### 2.1.1.2 Animales no humanos.

Los norovirus presentan una variedad de hospederos entre los que se encuentran principalmente roedores, los cuales son afectados por cepas del genogrupo GV y son generalmente asintomáticos (Baldrige *et al.*, 2016). Estudios en roedores inmunocomprometidos han mostrado la dispersión extra-gastrointestinal (bazo, hígado e intestino proximal) del virus, así como persistencia en heces durante meses (Wobus *et al.*, 2006).

Recientemente se han reportado infecciones mixtas de Parvovirus, Coronavirus y cepas del genogrupo GIV como GVI de NoV en casos de enteritis hemorrágica severa en animales domésticos (Tse *et al.*, 2012). Igualmente, en países europeos, americanos y asiáticos se han detectado las cepas GII.11, GII.18 y GII.19 en heces de cerdos asintomáticos. Estas cepas presentan gran similitud con los NoV humanos; sin embargo, la prevalencia en este ganado es menor al 6% por lo que no se han relacionado sus productos alimenticios con brotes (Scheuer *et al.*, 2013).

El ganado bovino y caprino, al ser ambos de la familia *Bovidae*, presentan similitudes en el sistema digestivo que cuentan con cierta sinergia de infección entre las cepas GIII.1, GIII.3, GIII.2 junto a las variantes GIII.2 Jena y GIII.2 Newbury (Villabrúna *et al.*, 2019; Wolf *et al.*, 2009). El ganado ovino es asintomático, mientras que el ganado bovino suele presentar diarreas persistentes durante varios días (Villabrúna *et al.*, 2019). Los síntomas duran de 3 a 4 días y se pueden presentar complicaciones que van desde anorexia hasta necrosis del epitelio intestinal (Di Felice *et al.*, 2016).

#### 2.1.2 Virus subrogados

Hasta ahora, la investigación del HuNoV ha tenido relativamente poco desarrollo debido a la dificultad del virus para propagarse en cultivos celulares o, incluso, en modelos animales. Por esa causa, generalmente se restringe su estudio a investigaciones *in vitro* con inmunoensayos utilizando anticuerpos monoclonales para estudios de neutralización y

pruebas de variabilidad genética con suero recolectado durante los brotes epidemiológicos, o bien, se ha optado por el uso de voluntarios sanos (Allen *et al.*, 2017).

No obstante, en las últimas décadas se ha optado por realizar investigaciones en virus con características similares al HuNoV. Estos virus llamados subrogados, si bien aún no se comparan con el comportamiento real del HuNoV, permiten extrapolar hasta cierto punto la información obtenida en investigaciones (Tian *et al.*, 2013).

#### 2.1.2.1 Calicivirus felino (FCV)

Del género *Vesivirus* que pertenece a la familia *Caliciviridae*, fue de los primeros virus subrogados para el estudio del comportamiento del HuNoV debido a su gran similitud en cuanto a la organización genómica y su estructuración viral (Urakami *et al.*, 2007). La propagación de este virus se realiza en células renales felinas de Crandell Reese (CRFK) al ser afín a receptores JAM-1 como al ácido siálico del huésped (Poschetto *et al.*, 2007).

Actualmente es usado para extrapolar los datos de este frente a los procesos de inactivación, séanse estas temperaturas elevadas o de congelación, productos químicos o procesos de liofilización, irradiación, acidificación o procedimiento de alta presión en alimentos (Richards *et al.*, 2012). Sin embargo, este virus ha sido ampliamente cuestionado ya que no es un virus gastrointestinal, sino respiratorio y, por ende, tiene tendencia a ser más sensible a ciertos factores utilizados como inactivadores tales como el pH o procesos de secado. Es recomendable su uso en investigaciones en las que se desee exponer sobre superficies y cuantificar su supervivencia, (Mariita *et al.*, 2022)

#### 2.1.2.2. Norovirus murino (MNV-1)

Caracterizado por ser el virus subrogado favorito por estar directamente relacionado con HuNoV, se trata de un virus que infecta ratones que pertenece al genogrupo GV. Este se diferencia del HuNoV por poseer una región ORF4 superpuesta a la región codificante de la VP1 que se traduce durante la infección en células blanco y se cree está relacionada a la evasión de la respuesta inmune (McFadden *et al.*, 2011). Su replicación ocurre en células dendríticas y macrófagos, por lo que la propagación *in vitro* es aceptada haciendo posible que los datos obtenidos sean extrapolados. Esto se debe también a su similitud morfológica y genética, así como su estabilidad ambiental con el HuNoV comparada con el calicivirus felino (Hoelzer *et al.*, 2013).

Este virus es considerado el mejor sustituto disponible para la investigación del comportamiento del HuNoV por su semejanza en su propia biología de transmisión, por unión a receptor de ácido siálico (no se une a los receptores HBGA), la patogénesis y la excreción por heces (Richards, 2012; Tauber *et al.*, 2012).

#### 2.1.2.3 Colifago MS2 (MS2).

Propuestos como sustitutos alternativos debido a la facilidad de propagación y cuantificación, los colifagos masculino (F+) específico se propusieron debido a la asociación frecuente en heces humanas y de animales, y por su capacidad de infectar bacterias coliformes (Kim *et al.*, 2021).

El colifago F+ MS2 de ARN es miembro de la familia *Fiersviridae* y por sus características físicas, químicas y funcionales se asemeja al HuNoV. Por ese motivo se ha propuesto como modelo de estudio en la detección y persistencia sobre aguas, superficies y condiciones ambientales (Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, aun cuando lo anterior son puntos beneficiosos, estudios mencionan que el colifago MS2 sigue siendo un sustituto ineficiente para comparar con el HuNoV en términos de persistencia en alimentos que no sean de origen marino (Bae y Schwab. 2008; Allowood *et al.*, 2003).

#### 2.1.2.4 Virus de Tulane (TV)

Aislado a partir de las heces de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), es un virus de la familia *Caliciviridae* clasificado en un nuevo género llamado *Recovirus* spp. Según análisis filogenéticos, se encuentra altamente relacionado con los NoV del genogrupo GII (Hirneisen y Kniel, 2013; Li *et al.*, 2017).

Investigaciones recientes han propuesto la sustitución de MNV-1 por el virus de Tulane debido a que este último comparte con el HuNoV la unión de epítomos a antígenos HBGA. Sin embargo, el desarrollo de metodologías usando el TV en modelos animales está todavía en estudio ya que ni siquiera la patogénesis exacta en el macaco está totalmente comprendida (Hirneisen y Kniel, 2013).

Su propagación *in vitro* se da en células de riñón de macaco (LLC-MK2) donde se han visto las mismas lesiones patológicas que HuNoV. Actualmente no se han hecho suficientes estudios de inactivación de TV como se han hecho con MNV-1 o FCV. Un dato relevante es

que TV es más susceptible a la inactivación con productos químicos que a la inactivación por radiación o altas presiones (Tian *et al.*, 2014).

## 2.2 Factores de riesgo.

La incidencia de brotes ocasionados por HuNoV alrededor del mundo se debe a distintos factores estudiados con el fin de prevenir la alta morbilidad, especialmente en infantes o personas mayores con deficiencias inmunológicas que contraen la infección a partir de diversas fuentes (Hall *et al.*, 2013). Estos factores incluyen:

### 2.2.1 Edad

Aunque la mayoría de los pacientes que se infectan con HuNoV se recuperan por completo a las 24 a 48 h, los datos del CDC arrojan que menores a 5 años, mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas son las más afectadas, necesitando de hospitalización y, a veces, si la situación se agrava conlleva al deceso (Cannon *et al.*, 2021).

Baldrige *et al.* (2016) encontraron que aproximadamente el 70% de los casos de HuNoV ocurren en niños de 6 a los 23 meses de edad, destacando los menores de 12 meses debido a que son quienes generalmente requieren de hospitalización al presentar sintomatología más grave.

Los adultos mayores de 77 años que se encuentran inmunocomprometidos representan cerca del 7% de las infecciones de HuNoV a nivel mundial mientras que los adultos sanos mayores a 65 años representan cerca de un 11.1% (Woodward *et al.*, 2017).

### 2.2.2 Interacción con microbiota intestinal.

Se ha descubierto que la microbiota intestinal juega un papel relevante en la patogénesis del HuNoV, se ha demostrado el cambio en el perfil del microbioma intestinal en lactantes y adultos infectados con NoV, alterando poblaciones como *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp y *Streptococcus* spp (Bai *et al.*, 2023). Además, en pacientes graves se observó la reducción en *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp, lo que provocó el aumento de *Campylobacteraceae* spp, *Neisseriaceae* spp, *Methylobacteriaceae* spp, *Sphingomonadaceae* spp y *Enterobacteriaceae* spp. (Chen *et al.*, 2017). Esto, considerado efecto proviral, se cree se debe a que la microbiota se une a la cápside viral mediante receptores HBGA y con ello

provee estabilidad tanto celular como ambiental, ya que algunos microorganismos como bacilos y clostridios inducen, por síntesis de metabolitos, la secreción de citoquinas que permiten al virus escapar fácilmente del ataque inmunológico del huésped (Budicini y Pfeiffer, 2022)

El efecto antiviral se debe principalmente al aumento de bacterias probióticas tales como diferentes cepas de *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp las cuales modulan y promueven la maduración de células inmunológicas, inhiben o reducen la multiplicación del NoV mediante la secreción de bacteriocinas o la estimulación de mecanismos de defensa microbiana (Bai *et al.*, 2023; Baldrige *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Condiciones ambientales.

La mayor incidencia de casos de NoV se reporta en temporada de invierno, en especial entre los meses de noviembre a abril donde, según información del CDC, ocurren cerca de 400 casos que no se relacionan con alimentos como vehículo (Rohayem, 2009). Conocida como la “enfermedad de los vómitos de invierno”, usando subrogados de HuNoV, se ha detectado que los virus sobreviven y son capaces de infectar a temperaturas que van desde los 2.5 °C hasta los 40 °C (Greer *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos análisis permiten inferir que son capaces de infectar aun en temperaturas de -6 °C, (Lee *et al.*, 2015).

Además, la humedad relativa y las precipitaciones juegan un papel relevante en la propagación de las cepas. Se demostró que entre subrogados de HuNoV fueron infectivos a 30% y 70% de humedad relativa, sin embargo, se cree que el HuNoV tiene como humedad relativa optima de 55 a 66% (Shamkhalí y Deng, 2016). Las precipitaciones, además, permiten que las plantas de tratamiento de aguas los sistemas se saturen por lo que se liberan aguas sin tratamientos completos (Lee *et al.*, 2015).

## 2.3 Transmisión

La vía de transmisión para el HuNoV es oral-fecal, con una dosis baja de virus (10 partículas virales), se disemina a través de aerosoles durante o después del vómito o durante el episodio diarreico (Murata *et al.*, 2017). La propagación rápida del virus a través de diferentes rutas, en especial de persona a persona, por alimentos o por contacto con partículas

dispersas en el medio ambiente le da ventaja para entrar a infectar a sus huéspedes (Koo *et al.*, 2010). La otra forma de transmisión conocida como transmisión secundaria, se da generalmente desde niños infectados hacia adultos, mediante fómites contaminados desde una persona infectada hacia otros por contacto (Thornton y Jennings, 2004; Lopman *et al.*, 2012).

Cerca de 23 millones de casos esporádicos de HuNoV en niños, adultos mayores, inmunocomprometidos, viajeros, personas en cruceros, hospitales, guarderías y hogares de ancianos se han relacionado con alimentos (Parra *et al.*, 2017). La ingesta y el riego de alimentos con agua contaminada con heces representan la mayor vía de transmisión. Sin embargo, también se pueden incluir mariscos como almejas y ostras, y las frutas y verduras como lechuga, tomate, frambuesas, fresas, entre otros (Hardstaff *et al.*, 2018; Predmore y Li, 2011).

## 2.4 Epidemiología

### 2.4.1 Internacional

Durante más de 20 años la mayoría de las gastroenteritis reportadas a nivel mundial han sido causadas por cepas del genogrupo GII de HuNoV entre las que se encuentran principalmente GII.4 Sydney, seguido de GII.2, GII.3, GII.6 y GII.17 (Ao *et al.*, 2023). Anualmente, el CDC reporta 685 millones de afectados en todo el mundo, 200 millones requieren hospitalización y 50 mil decesos, principalmente adultos mayores.

Los brotes más recientes reportados se dieron por consumo de ostras crudas provenientes de la Bahía de Galveston, Texas, las cuales hasta abril del 2023 habían afectado a 322 personas (Departamento de Estado de Texas, 2022). En 2019, Lu *et al.*, de China reportaron la presencia de GIIPe/GII4-Sydney\_2012, GIIP12/GII3, GIIP7/GII6, GIIPe/GII3, y GIIP16/GII2 en muestras de heces provenientes de niños de entre 7 y 12 meses de edad. Estos pacientes mostraron síntomas de gastroenteritis y acudieron a visita hospitalaria. Se observó prevalencia de infección mayor en los meses de otoño e invierno. En 2022 se reportaron 471 muestras de heces positivas a HuNoV provenientes de 4,950 personas que acudieron con síntomas gastrointestinales a consulta en hospitales de Valencia, España. En este caso, se

detectaron las cepas GII4-Sydney\_2012, seguido de GII2, GII3, GII6 y GII17 además de cepas recombinantes (Navarro *et al.*, 2022).

En Nigeria, Arowolo *et al.* (2023) realizaron un ensayo de diversidad genética con muestras recolectadas entre 2015 y 2017 en niños menores de 5 años. En ese caso se identificaron en 13 de un total de 173 muestras a las cepas GII.12P4, GII.P30, y GII.P31 de HuNoV. El 55.6% de estas estaban en infección mixta con otros virus gastrointestinales como rotavirus y adenovirus humano. Este estudio sirvió para establecer la presencia de cepas recombinantes intergenotípicas que están circulando en África y demostrar la necesidad avanzar en la secuenciación del virus; con el fin de aumentar la vigilancia epidemiológica y guiar la producción de vacunas de protección cruzada.

Lu *et al.*, en 2020 realizó muestreo en afectados que presentaban vómito y diarrea después del consumo de alimentos de entrega rápida en China, pudiendo identificar como responsable a la cepa GII.3 de HuNoV. De forma similar, Wadl *et al.* (2010) analizaron 815 personas de una base militar en Alemania quienes acudieron a consulta con síntomas gástricos. El 12.8% de las muestras fueron positivas a HuNoV GII, después de análisis se asoció la infección a la ingesta de ensalada. Igualmente, en Corea del Sur, 142 personas resultaron con diarrea y vómito después de ingerir alimentos en una cafetería en 2008. De los afectados 45% fueron positivos a GII.4 de HuNoV (Yu *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 México

En México no hay mucha información de los agentes causantes de gastroenteritis que llegan a hospitalización. Sin embargo, semanalmente la Secretaría de Salud actualiza boletines epidemiológicos en los que se reportan algunos virus gastrointestinales más no el HuNoV. Sin embargo, hay investigaciones que reflejan su persistencia en muestras clínicas.

En 2019, Cervantes *et al.*, realizaron la búsqueda de cepas del GI y GII de HuNoV en 106 pacientes que llegaron a urgencias para hospitalización en Ciudad de México. El 93.2% de los casos resultaron positivos a GII y el 6.8% a GI; de estos el 57.1% de las muestras pertenecían a niños de 2 a 5 años. Como factor relevante, la mayoría de las personas consultadas fue en los meses de verano (julio a septiembre). Solamente 5 personas mostraban más de un patógeno bacteriano o viral.

Casillas *et al.*, en 2020 realizaron el análisis de 240 muestras fecales de pacientes hospitalizados por diversos motivos en Nuevo León. Se encontró que el 28.6% de las muestras eran positivas a HuNoV GI (2.2%) y GII (26.9%) y la mayoría de los pacientes tenían menos de 10 años y mostraban coinfección entre patógenos. Previamente Enríquez (2014) analizó heces de 100 personas que asistieron al hospital por síntomas gastrointestinales en Sonora, encontrando 77% de muestras positivas a HuNoV GI y GII. En ese caso menores de 4 años fueron los principales afectados; la fuente de transmisión estaba asociada a una pobre higiene.

En relación con la presencia de HuNoV en alimentos, se analizaron 134 muestras de vegetales frescos, 50 productos frutales congelados y 54 ostras no procesadas en Ciudad de México. El 7.6% (perejil y verdolaga) estaban contaminadas con HuNoV, al igual que en ostras (5.5%), sin embargo, no se encontró en frutas congeladas. Esta contaminación se asoció al riego con aguas no tratadas, la mala práctica de recolecta y almacenamiento de los productos y a no aplicar un tratamiento de inactivación efectivo previo al consumo (Parada *et al.*, 2016). Villacana *et al.* (2019) analizaron la prevalencia de GII.P13 HuNoV en ostras crudas comercializadas en Sinaloa. De 68 muestras, el 57.3% dieron positivo a HuNoV, especialmente de aquellas tomadas durante los meses de octubre-noviembre.

## 2.5 Métodos de detección del norovirus.

### 2.5.1 Detección en el área clínica.

#### 2.5.1.1 Métodos moleculares.

El diagnóstico clínico de HuNoV generalmente se basa en síntomas del paciente, pero requiere de pruebas moleculares a partir de muestras de heces para confirmarse. De forma requerida, la detección en el área clínica se suele realizar por pruebas como la RT-PCR convencional. Sin embargo, en el área de los alimentos y muestras ambientales el uso de RT-qPCR ofrece ventajas frente a otras técnicas por su alta sensibilidad para detectar múltiples cepas simultáneamente. Además, permite estimar la carga viral en la muestra (Shah y Hall, 2019; Pang *et al.*, 2005).

### 2.5.1.2 Métodos inmunológicos.

Ante la necesidad del sector clínico de pruebas rápidas, sensibles y económicas se han desarrollado investigaciones para innovar el campo de detección viral. Aunque en 2010 Kirby *et al.*, propusieron la utilización de ensayos inmunológicos de tercera generación aprobados por los CDC (RIDASCREEN, RIDAQUICK ICG e IDEIA) para detección de HuNoV a partir de muestras fecales, estos requieren de confirmación por RT-qPCR.

La comparación de los resultados de 726 muestras de heces realizadas por RT-qPCR y métodos inmunológicos demostraron que RIDASCREEN y RIDAQUICK tienen mayor especificidad (< 95%), pero baja sensibilidad (63% y 69% respectivamente). El IDEIA tuvo una menor sensibilidad (45%) para la detección de cepas GI y GII de HuNoV.

### 2.5.1.3 Sistemas automatizados.

Recientemente un conjunto de técnicas basadas en RT-PCR se han estado utilizando para detección e identificación de cepas de HuNoV, como RGN RT-PCR, BD MAX, Xpert Norovirus y xTAG GPP. Estos sistemas automatizados buscan disminuir los falsos positivos al detectar una región del gen ORF2 o la secuencia conservada de unión ORF1-ORF2. Entre estos, ensayos probados en heces de personas con sintomatología, mostraron que el sistema BD-MAX y el Xpert Norovirus fueron los mejores con sensibilidad y especificidad superiores al 90% y 100% respectivamente mientras que en el xTAG GPP ambos parámetros fueron inferiores a 87% (McHugh *et al.*, 2018; Kanwar *et al.*, 2022).

## 2.5.2 Detección ambiental y alimentos.

### 2.5.2.1 Métodos moleculares.

Debido a limitaciones encontradas en la técnica de RT-qPCR, se ha buscado desarrollar otras que utilicen el ARN viral. En ese caso se conocen la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) o la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcrito inverso (RT-LAMP), las cuales se considera que no necesitan gran refinamiento y pueden estar a la par de la RT-qPCR. Sin embargo, la problemática de su utilización es que solo se ha propuesto en alimentos marinos y aguas superficiales, en donde su sensibilidad permite detectar poco menos de 100 copias genómicas (Gyawali *et al.*, 2019; DiCaprio, 2017; Leifels *et al.*, 2021).

### 2.5.2.2 Biosensores

Por su parte en 2022, Kimura *et al.*, desarrollaron un método basado en espectrofotometría de masas de reacción paralela (PRM); donde se detectan péptidos representativos de la VP1 para identificar seis genotipos diferentes de HuNoV. Además, propusieron que la técnica podía ser cuantitativa al agregársele péptidos marcados con isótopos. Usados en muestras de alimentos (Weerathunge *et al.*, 2019) y muestras de pacientes infectados confirmados con RT-qPCR, encontraron que esta técnica se podía utilizar para diagnóstico y, además, al ser un ensayo proteómico, pudiera también proporcionar un panorama de la microbiota de personas infectadas. Sin embargo, también cuenta con limitaciones que tienen que ver con la falta de validación para optimizar y mejorar la técnica.

Además, se han desarrollado biosensores basados en quimioluminiscencia (CLIA) en los que se usan aptámeros de ADN (modificados con guanina) para la detección de genogrupos de HuNoV; con excelente especificidad y reproductibilidad en muestras de aguas y orina. El uso de la quimioluminiscencia presenta mayor sensibilidad frente al uso de sensores basados en absorbancia UV o fluorescencia. Las ventajas son que ahorra tiempos de pretratamientos, incubaciones y costos a comparación con otras técnicas. El biosensor desarrollado por Kim *et al.*, (2018) logró detectar hasta 80 ng/ml de cápside viral de GII, ampliando el uso de estas tecnologías para detección de otros virus y bacterias patógenas.

### 2.5.2.3 CRISPR-Cas

En la actualidad se están desarrollando técnicas como CRISPR-Cas combinada con un enriquecimiento del blanco por una preamplificación de ARN para detección de diversos virus de importancia médica. Usando diversas variantes de la nucleasa Cas como Cas13a o Cas12a se han logrado análisis múltiples, rápidos y con una sensibilidad de detección de hasta 10 copias/ $\mu$ l. Esto es consistente con resultados obtenidos mediante RT-PCR, además no presenta reactividad con otros virus gastrointestinales (Fang *et al.*, 2023). Sin embargo, la aplicación de la técnica CRISPR-Cas13a realizada por Duan *et al.*, (2022), mostró mejor sensibilidad de detección siendo esta de 5 copias/reacción.

Los sistemas de detección por Cas se clasifican basado en su actividad de endonucleasa y su unión a ADN o ARN. El sistema SHERLOCK (C2c2, Specific High sensitivity

Enzymatic Reporter unLOCKing) es usado para el diagnóstico de ARN basado en la unión de Cas13a dirigida por ARN guía. Una vez en el sitio diana, el complejo Cas13a:gARN median la escisión en trans del blanco y activan ARN reportero que permite la detección en tiempo real. Similar a este, el sistema DETECTR (Cpf1, DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter) se basa en la amplificación exclusiva de ssADN como dsADN por acción de la Cas12a. En ese caso, la proteína reconoce la secuencia protoespaciadora (PAM), estimula la maduración de su ARN guía y genera la escisión del dsADN distal a PAM e igualmente del reportero de ssADN (Chen *et al.*, 2018; Gootenberg *et al.*, 2017).

De estos, el sistema SHERLOCK ha tenido nuevas versiones (SHERLOCKv2) convirtiéndose en un análisis cuantitativo que utiliza a la Cas13, Cas12 y Csm6 para detectar mediante una sola reacción diversos objetivos. En los últimos años el uso de CRISPR-Cas en el diagnóstico de patógenos comunes o emergentes sin necesidad de equipo especializado, procesamientos costosos o incluso tiempos largos para la obtención de resultados, se visualiza como una tecnología en ascenso. Esta es una técnica ultrasensible que ayuda a la detección aunque se presenten diferencias dadas por la carga viral variable en las diversas etapas de infección, el tipo de muestra o el método de concentración viral. El sistema SHERLOCK es considerado superior al DETECTR siendo de este último la principal desventaja, que no es aplicable en el diagnóstico viral (Mustafa y Makhawi, 2021; Yin *et al.*, 2021).

### 2.5.3 Integridad de la cápside.

La mayoría de los experimentos mencionados sólo pueden detectar el ARN viral sin considerar la integridad de la cápside y, por ende, no determinan la infectividad potencial del virus. Para esto se han propuesto nuevas técnicas y pretratamientos que ayuden a identificar la infectividad viral por sobre la presencia de ARN (Leifels *et al.*, 2021).

Usando subrogados virales, se han probado diferentes técnicas entre las que se incluyen el cultivo celular integrado a RT-PCR (ICC-RT-PCR). En ese caso las ventajas son ahorro de tiempo, aumento de sensibilidad a diferencia de las técnicas por separado y detección de ARN viral de largo alcance (long RT-qPCR). En este último se presenta menor sensibilidad que la RT-qPCR pero es capaz de detectar genomas dañados después de exposición a procesos de inactivación (Rodríguez *et al.*, 2009). Se han clasificado como PCR de viabilidad

aquellos tratamientos enzimáticos para degradar cápsides dañadas (proteinasas K) y/o degradar ARN viral libre (ARNasa) y la RT-qPCR como mucina gástrica porcina (PGM-MB-qPCR) donde se aprovechan los receptores de unión del subrogado (DiCaprio, 2017; Cook *et al.*, 2016).

Los tratamientos enzimáticos presentan diferencias en el modo de acción, la unión a sustrato y la estabilidad. Tal es el caso entre las variantes de ARNasa A y ARNasa ONE donde la segunda, aunque es la más usada, tiene una especificidad reducida en viabilidad viral, pero una acción superior a la ARNasa A una vez comparadas con la RT-qPCR (Knight *et al.*, 2012).

El desarrollo de técnicas para discriminar células viables acopladas a RT-PCR en las que se usan colorantes intercalantes como la monoazida de etidio (EMA) y propidio (PMA) y otros como PMAxx se está estandarizando en investigaciones relacionadas a la inactivación viral; esto debido a una disminución de señales en la RT-qPCR. Además, entre las desventajas entre EMA y PMA se encuentra la adición al primero de iones metálicos para una función correcta (Monteiro y Santos, 2017; Parshionikar *et al.*, 2010).

## 2.6 Tratamiento

En general, no existe un tratamiento para la gastroenteritis aguda causada por HuNoV, los síntomas se tratan reemplazando la pérdida de líquidos con sueros enriquecidos con sales y glucosa e ingesta de alimentos de forma controlada (Churgay y Aftab, 2012). El uso de adyuvantes para la diarrea, vómito, dolor de estómago y agentes probióticos suelen ser comúnmente recetados para aminorar la sintomatología de la infección (Shah *et al.*, 2019).

El desarrollo de antivirales no se ha abordado debido a que es una infección autolimitante de poca duración. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas con infección persistente hasta por 7 semanas se usa nitazoxanida. También se ha propuesto aplicar al mismo tiempo ribavirina o inmunoterapias pasivas con anticuerpos monoclonales que prevengan la unión y entrada del HuNoV a sus células blanco (Kaufman *et al.*, 2014; Netzler *et al.*, 2018; Dang *et al.*, 2018).

Otra terapia preventiva desarrollada sin gran avance es la vacunación. Actualmente existen tres en estudio usando partícula P de la cápside, virus no replicantes o adenovirus recombinantes. Estas vacunas, según Esposito *et al.*, (2020), aún se encuentran en etapa 2 y su éxito es debatible ya que aquellas que usan partículas P y virus no replicantes, son capaces de provocar inmunidad deseable. Las que usan partículas P estimulan el sistema inmunológico y son de fácil producción usando a *E. coli* como vector; mientras que la vacuna de virus no replicantes produce una reacción cruzada equilibrada entre células Th1 y Th2 (Netzler *et al.*, 2018).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los HuNoVs son los principales responsables de brotes de gastroenteritis aguda de forma esporádica transmitidos por alimentos alrededor del mundo. Su fácil transmisión mediante agua, alimentos y superficies contaminadas, así como su alta resistencia a diferentes condiciones ambientales, tratamientos químicos y físicos, hace que las tasas de hospitalización y decesos vayan en aumento.

Los HuNoVs generalmente están asociados a alimentos como mariscos, frutas y vegetales. La presencia de HuNoV en un alimento obligaría al productor a retirar lotes de producto ocasionando pérdidas económicas, así como la posibilidad de causar un brote. Debido a la diferencia entre estas matrices alimentarias y a los bajos niveles de partículas virales presentes en estos, hace que la detección de HuNoV sea por métodos moleculares.

La falta de un modelo animal o celular adecuado para responder a las preguntas de sobrevivencia y patogénesis del HuNoV ha conducido a los investigadores a utilizar virus subrogados. En especial el norovirus murino (MNV-1) que se adecua por su cercanía estructural y genómica a los HuNoVs. Sin embargo, no es la única problemática ya que actualmente la cuantificación en alimentos se realiza bajo la normativa ISO o el BAM, estas no toman en cuenta la integridad de la cápside, parámetro que incluye la infectividad viral.

A causa de esto, en el presente trabajo se propone comparar las concentraciones virales obtenidas por técnicas moleculares (RT-qPCR y CRISPR-Cas) con la técnica celular de infectividad (TCID<sub>50</sub>) posterior a un pretratamiento enzimático con ARNasa. Esto con el fin de ampliar el panorama de pruebas alternativas a la RT-PCR y a la vez diferenciar partículas virales infecciosas de partículas virales dañadas o ARN libre.

## 4 HIPÓTESIS

La concentración viral de MNV-1 pretratado con ARNasa que se detecta con RT-qPCR y CRISPR-Cas13a son similares a los obtenidos por la técnica de TCID<sub>50</sub>.

## 5 OBJETIVOS

### Objetivo general

- Comparar los métodos de cuantificación viral de partículas potencialmente infecciosas de MNV-1 pre-expuesto a diferentes temperaturas de almacenamiento por la técnica celular TCID<sub>50</sub> con las técnicas moleculares RT-qPCR y CRISPR-Cas13a posterior a la aplicación de un pretratamiento enzimático con ARNasa.

### Objetivos específicos

- Estandarizar las técnicas de RT-qPCR, CRISPR-Cas y TCID<sub>50</sub> para detección de partículas virales de MNV-1.
- Implementar los métodos de RT-qPCR, CRISPR-Cas y TCID<sub>50</sub> para la cuantificación de partículas infecciosas y no infecciosas de MNV-1.
- Evaluar los títulos virales obtenidos por las técnicas moleculares RT-qPCR y CRISPR-Cas y comparados con la técnica celular TCID<sub>50</sub> con y sin pretratamiento enzimático con ARNasa frente a diferentes temperaturas de preexposición.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Mantenimiento de línea celular.

El cultivo de células de macrófago murino RAW 264.7 (ATCC TIB-71) se realizó utilizando Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM, del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium; Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A.). Este fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Corning, NY, E.U.A.), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A.), 1% de HEPES (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A.) y 1% de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A.). Las células se incubaron a 37 °C en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.2 Propagación viral de MNV-1.

El MNV-1 (Murine norovirus 1 ATCC VR-1937), subrogado de HuNoV, se propagó, en células de macrófago murino RAW 264.7 en cajas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y se resguardó en el laboratorio en criotubos a -80 °C. Para ello, se realizaron ciclos de reinfección en cajas de cultivo previamente tratadas e incubadas hasta la formación de monocapa de las células RAW 264.7 con confluencia del 60-80 %. Se les retiró el medio por aspiración y se lavaron con PBS para inmediatamente después añadirles la alícuota viral (MOI 0.1-1).

Una vez añadida la alícuota a la caja, se le agregó medio suplementado y se homogenizó dejando incubar 72 h a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>. El cultivo infectado se colocó en tubos Falcon de 15 ml, se almacenó a -80 °C durante 24-48 h y se procedió a realizar 3 ciclos de congelado-descongelado a temperatura ambiente con el fin de romper las células. La muestra fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 min, y se recuperó el sobrenadante en tubos Falcon. La suspensión viral obtenida se alicuotó en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 6.3 Titulación de partículas virales por RT-qPCR

La cuantificación de ARN viral se realizó por RT-qPCR de dos pasos, iniciando con una transcripción inversa de ARN en el equipo Veriti (Thermo Fisher, Waltham, E.U.A) utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, E.U.A). Las reacciones con 20 µl de volumen final estuvieron formuladas por 10 µl de ARN muestra, 2 µl de buffer RT, 0.8 µl de dNTPs, 2 µl de oligonucleótidos, 1 µl de enzima RT y

4.2 µl de agua libre de nucleasas. La síntesis se realizó con un ciclo de 10 min a 25 °C, seguido de 120 min a 37 °C y por último, 5 min a 85 °C.

Posteriormente, el ADN complementario (ADNc) previamente sintetizado, se usó para realizar la RT-qPCR con el fin de obtener curvas de amplificación estándar y con ello el número de copias genómicas totales. Después, se utilizó el Kit SensiFAST Probe No-ROX (Meridian Bioscience, E.U.A.) para realizar reacciones con volumen final de 25 µl compuestas por 3 µl de templado, 0.5 µl de cada oligonucleótido, 0.2 µl de la sonda específica (Tabla 1), 5 µl de mix enzimático NO-ROX y agua libre de nucleasas. Estas se colocaron en una placa de 96 pocillos incluyendo un control positivo de amplificación y uno sin templado (NTC). Las placas se cubrieron con una cubierta adhesiva óptica para correrse en el equipo PikoReal (Thermo Fisher, Waltham, E.U.A) con 1 ciclo de 3 min a 95°C y 45 ciclos que incluyen desnaturalización (95 °C / 15 s), alineamiento (55 °C / 20 s) y extensión (62 °C / 60 s).

Se analizaron los datos obtenidos por el equipo según la gráfica de amplificación estándar usando un gBlock (IDT, E.U.A.) y se realizaron los cálculos de cuantificación viral correspondiente a la multiplicación de copias virales por el factor de dilución.

Tabla 1. Oligonucleótidos y sonda para cuantificación de MNV-1.

Blanco	Iniciador/Sonda	Secuencia 5'-3'	Referencia
MNV-1	Forward	TGC AAG CTC TAC AAC GAA GG	(Hewitt <i>et al.</i> , 2009)
	Reverse	CAC AGA GGC CAA TTG GTA AA	
	Sonda	CCT TCC CGA CCG ATG GCA TC	

#### 6.4 Pretratamiento con ARNasa

Las partículas virales alicuotadas fueron expuestas a 3 tratamientos térmicos diferentes: 80 °C / 2 min, -20 °C / 5 min, 5 °C / 10 min y a temperatura ambiente como control. Después de aplicar el tratamiento térmico, las muestras se trataron con ARNasa ONE (RNase ONE™ Ribonuclease, Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA) y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Se tomó 100 µl de suspensión viral en un tubo Eppendorf de 200 µL y, después de mezclar brevemente, se procedió a exponer por separado a los diferentes tratamientos térmicos a 80 °C / 2 min, -20 °C / 5 min y 5 °C / 10 min utilizando el termociclador Veriti (Thermo Fisher, E.U.A). Posteriormente, se le añadió a cada suspensión viral 2 µl (20 U) de

RNAse ONE junto con 10 µl de buffer de reacción, se incubó a 37 °C / 15 min y se enfrió a 4 °C. Las muestras preparadas con 10 µl de buffer de reacción y 130 µl de PBS frío fueron utilizadas como control negativo.

#### 6.5 Extracción ARN viral

La extracción del ARN viral se realizó mediante uso del kit comercial QIAamp viral RNA Mini (QIAGEN, Hilden, Renania del Norte-Westfalia, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se añadió 140 µl del virus tratado o no con ARNasa en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, después se agregaron 560 µl de solución AVL, se le dio vórtex por 15 seg y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

Luego, se le añadieron 560 µl de etanol 96 %, se agitó con vórtex y se centrifugó a 2000 x g por 20 seg para eliminar gotas en la tapa. Se preparó un tubo con columna y se le añadieron 630 µl de la mezcla anterior para centrifugar a 8,000 x g por 1 min. Este lavado se realizó dos veces con la mezcla descrita y dos veces más utilizando 500 µl de la solución AW1 y AW2, centrifugando en cada caso a 8,000 x g durante 1 min.

La columna conteniendo el ARN se centrifugó a 14,000 x g durante 3 min, se pasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Luego se agregó 80 µl solución AVE para proceder a centrifugar a 8,000 x g durante 1 min. Se eliminó la columna y el producto filtrado se guardó a -20 °C hasta su uso.

#### 6.6 Detección por TCID<sub>50</sub>.

Para realizar el ensayo, el MNV-1 tratado con y sin ARNasa se descongeló a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas en una proporción 1:9 en medio DMEM y se procedió a tomar 25 µl de las diluciones a cuantificar. Esto se llevó a una placa de 96 pocillos a la que previamente se le añadieron 225 µl de medio DMEM y se realizaron 8 diluciones.

Previamente, al cultivo celular realizado (Punto 6.1) se le cambió el medio suplementado para después raspar la monocapa celular y obtener una suspensión celular con densidad de  $1.4 \times 10^4$  / 100 µl de células. Por cada dilución a cuantificar se preparó una placa de 96 pocillos con 100 µl de células y se incubó a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

Después de ese tiempo, a la placa se le aspiró cuidadosamente el medio de mantenimiento suplementado, se lavó con PBS pH 7.4 y se procedió a inocular con 50 µL de las diluciones

virales preparadas previamente. Se incubó la placa por 30 min a 37 °C en condiciones de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Una vez pasado la incubación, se le añadieron 100 µl de medio DMEM suplementado con 2 % de suero fetal bovino (FBS; Corning, NY, E.U.A.), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A.), 1 % de HEPES (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A) y 1 % de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher, Massachusetts, E.U.A). Se dejó incubar durante 5 días y se procedió a cuantificar los valores de TCID<sub>50</sub>/ml según la fórmula establecida por Reed y Muench (1938; Tabla 2).

Tabla 2. Fórmulas para cálculos de títulos virales por TCID<sub>50</sub>.

	Fórmula
Distancia proporcional (PD)	$\frac{(\% \text{ positivas } > 50\%)}{(\% \text{ positivas } > 50\% - \% \text{ positivas } < 50\%)}$
Logaritmo de TCID <sub>50</sub>	$\text{Log}(\text{Dilución de positivas } > 50\%) + (-PD)$
TCID <sub>50</sub> /ml	$\frac{1}{10^{\text{LogTCID}_{50}}}$ Factor de dilución

## 6.7 Estandarización y detección por CRISPR-Cas13a.

### 6.7.1 Amplificación isotérmica de la polimerasa recombinasa (RT-RPA).

Las secuencias de oligonucleótidos con blanco a la proteína de cápside viral VP1 para la detección por RPA y el gARN para la posterior detección por Cas13a se encuentran descritas en la tabla 3. La detección mediante el sistema CRISPR-Cas13a se inició utilizando el kit TwistAmp Basic Kit (TwistDx™, Cambridge, Inglaterra) modificando la reacción del proveedor. La reacción se realizó en un tubo Eppendorf de 200 µl que contenía 2.4 µl de cada RPA oligonucleótidos (10 µM), 29.5 µl de Buffer de rehidratación, 2 µl de enzima RT (50 U/µl), 2 µl de dNTP (100 mM), 5 µl de ARN muestra y 4.2 µl de agua libre de nucleasas. Se mezcló la reacción, se tomaron los 47.5 µl y se añadieron al tubo con el pellet para rehidratar.

Finalmente se agregaron 2.5 µl de acetato de magnesio (MgOAc, 280 mM) y se incubó a 39°C durante 20 min en el termociclador Veriti (Thermo Fisher, E.U.A) mezclando vigorosamente a los 4 min de incubación. Se guardaron las reacciones a -20 °C hasta su uso.

### 6.7.2 Detección por CRISPR-Cas13a

La detección por CRISPR-Cas13a se realizó en conjunto con la transcripción del T7. Para la realización de esta reacción se prepararon alícuotas de la enzima Cas 10  $\mu\text{M}$  (GenScript, Kallang, East Wing, Singapore) resuspendiendo la enzima en buffer de reacción Cas13a 10x del proveedor. El gARN se resuspendió a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  en agua libre de nucleasas. Ambas alícuotas se mantuvieron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La reacción se realizó en frío estando compuesta por 10  $\mu\text{l}$  de producto RT-RPA, 5  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  BSA) 0.50  $\mu\text{l}$  de Cas13a, 2  $\mu\text{l}$  de gARN, 3  $\mu\text{l}$  de inhibidor murino de ARNasa (40 U/ $\mu\text{l}$ ), 6.25  $\mu\text{l}$  de rNTPs (5 mM), 2.5  $\mu\text{l}$  de T7 ARN polimerasa (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de reportero de ARN y 15.75  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas. Se mezcló en vórtex brevemente y se alícuotó en una placa de 96 pocillos evitando generar burbujas, se realizó por triplicado.

Inmediatamente después, la placa de 96 pocillos se retiró del hielo y se introdujo al equipo PikoReal (Thermo Fisher, Waltham, E.U.A) para comenzar con la lectura de fluorescencia en condiciones de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h con intervalos de 5 min.

Tabla 3. Secuencias utilizadas para detección de MNV-1 mediante CRISPR-Cas13a.

	Secuencia (5'-3')	Referencia
Promotor T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA	
RPA forward	TGG CCG CCT TCT TTC TAA GCC GCC GGC TGA	
RPA reverse	AGT CGA CCA TCC GGT AGA TGG TTC TCT CTA	
gARN	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUA AAACGGGGGGAGUUAGGUAGACAAAAUUGAAA	Diseñado en este estudio

### 6.8 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de comparación de medias entre la concentración viral obtenida por los métodos de RT-qPCR, CRISPR-Cas13a y  $\text{TCID}_{50}$  después de la exposición a los tratamientos de inactivación térmicos antes del pretratamiento enzimático con ARNasa. Cada ensayo fue realizado por triplicado con 2 repeticiones técnicas.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Cuantificación por RT-qPCR y características del inóculo.

Con el fin de obtener la cuantificación de las alícuotas virales de MNV-1 propagadas en cultivo, se realizó la curva estándar usando diluciones en serie ( $10^7$  a  $10^0$  copias genómicas totales del blanco de RT-qPCR) del gBlock. Se calculó la ecuación de la recta obteniendo una  $R^2$  de 0.998 y una eficiencia de reacción del 102.15 %, en la cual se tuvieron señales positivas en Ct que iban desde  $17 \pm 0.24$  hasta el Ct  $37 \pm 1.50$  (Figura 1). Esta misma curva de calibración nos permite establecer un límite de detección teórico de un Cq de 39.98, correspondiendo a una cuantificación técnica de 10 copias genómicas totales.

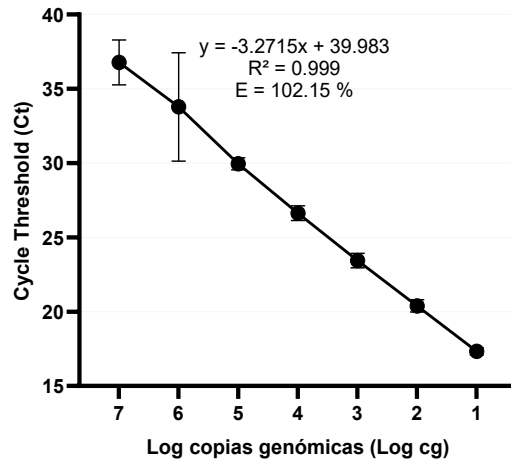


Figura 1. Curva estándar de detección de MNV-1 por RT-qPCR. Cycle threshold (Ct) = Ciclo de cuantificación,  $\text{Log}_{10}$  copias genómicas = Logaritmo de copias genómicas.

## 7.2 Cuantificación por TCID<sub>50</sub>.

La cuantificación por medio de TCID<sub>50</sub> se realizó a partir de una alícuota viral de  $2.99 \times 10^{11}$  cg/ml (correspondiente a  $2.09 \times 10^7$  gc/rx) de concentración de MNV-1. Se cuantificaron concentraciones virales de trabajo ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$  cg/rx) y se observó un efecto citopático al día 6 en todas las placas siendo  $7.67 \pm 0.05 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml el título viral más alto detectado y  $1.867 \pm 0.00 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml el título viral más bajo cuantificable.

## 7.3 Cuantificación, sensibilidad (LOD), y especificidad por CRISPR Cas13a.

Para la cuantificación de CRISPR-Cas13a se realizó un análisis de regresión lineal simple a partir de la cuantificación por RT-qPCR. Se usaron concentraciones de trabajo ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$  cg/rxn) con los datos de fluorescencia a los cuales se les aplicó un análisis de pendiente máxima captados desde el minuto 0 hasta el minuto 75. El análisis dio una ecuación de la recta de  $y = 48.677x + -32.63$  con una  $R^2 = 0.990$  que permitió obtener las copias genómicas presentes en las distintas concentraciones y condiciones posteriores.

Con el fin de estimar el límite de detección de nuestro ensayo de detección por CRISPR se utilizaron las mismas concentraciones de trabajo ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$  cg/rxn) y se cuantificaron por CRISPR-Cas13a. Usando la última concentración conocida donde se obtuvo una detección y cuantificación positiva (threshold de 38.70 unidades de fluorescencia basado en 3x la desviación estándar de la media del control negativo), se estimó un límite de detección correspondiente a  $5.642 \log_{10}$  gc/ml  $\pm 1.406$  ( $1.08 \times 10^4$  cg/rxn) (Figura 2).

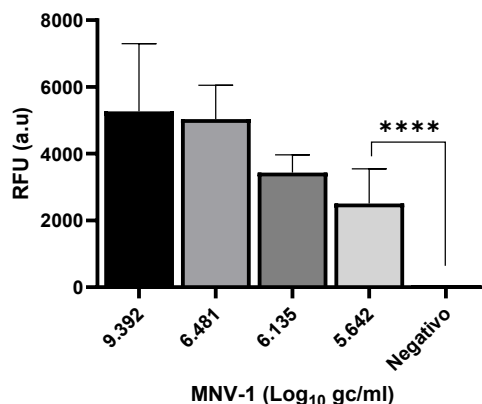


Figura 2. Límites de detección de CRISPR-Cas13a con MNV-1. RFU (a.u) = Unidades Relativas de Fluorescencia, Unidades Arbitrarias; gc/rxn = Copias genómicas por reacción.

Además, analizamos la especificidad de nuestro ensayo hacia nuestro blanco de MNV-1, evaluando la capacidad de detección por CRISPR-Cas13a contra otros blancos; norovirus humano GI y el virus de hepatitis A (Figura 3). Confirmando de esta manera que solo tenemos señal de fluorescencia en presencia de MNV-1, estableciendo una nula reactividad cruzada contra estos dos blancos.

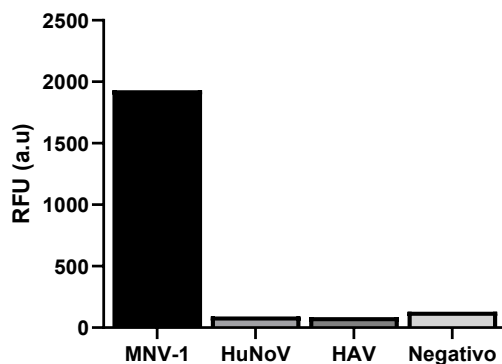


Figura 3. Ensayo de sensibilidad con diferentes blancos usando el guía diseñado para MNV-1. RFU (a.u) = Unidades Relativas de Fluorescencia, Unidades Arbitrarias; MNV-1= Norovirus murino, HuNoV = Norovirus humano HAV = Virus de hepatitis A.

#### 7.4 Estandarización del ensayo de pre-tratamiento con ARNasa.

A partir de una alícuota viral de  $2.99 \times 10^{11}$  cg/ml ( $2.09 \times 10^7$  gc/rxn) de concentración de MNV-1, se extrajo el ARN viral para la posterior estandarización del tratamiento enzimático con RNase ONE™ usando una concentración de 20 U. Utilizando concentraciones de ARN extraído correspondientes a  $10^6, 10^4, 10^2$  y  $10^0$  cg/rxn, se observó que el porcentaje de reducción disminuye a la par que disminuye el título viral detectado (Tabla 4). El menor porcentaje de reducción obtenido fue 13.87 % correspondiente a  $2.09 \times 10^0$  cg/rxn, mientras que el mayor porcentaje de reducción correspondiente a 80.76 % se observó en la más alta concentración de  $2.09 \times 10^6$  cg/rxn. Esta reducción de ARN libre en cada una de las concentraciones virales corresponde a la máxima eficiencia de la enzima bajo nuestras condiciones de tratamiento.

Tabla 4. Reducción de ARN posterior a un pretratamiento con ARNasa

MNV-1 (cg/rxn)	LOG <sub>10</sub> cg/ml		
	ARNasa (-)	ARNasa (+)	% reducción
$2.09 \times 10^6$	$7.94 \pm 0.17$	$7.23 \pm 0.42$	80.76
$2.09 \times 10^4$	$7.45 \pm 0.70$	$7.00 \pm 0.23$	64.25
$2.09 \times 10^2$	$6.61 \pm 0.10$	$6.28 \pm 0.68$	53.31
<u>2.09</u>	$6.02 \pm 0.62$	$5.96 \pm 0.90$	13.87

MNV-1 = Norovirus murino, cg/rxn = Copias genómicas por reacción, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro, ARNasa (-) = Tratamiento sin ARNasa; ARNasa (+) = Tratamiento con ARNasa.

#### 7.5 Cuantificación de MNV-1 pre-expuesto a temperaturas de -20, 5 y 80 °C y pre-tratado con ARNasa por medio de TCID<sub>50</sub>, RT-qPCR y CRISPR-Cas13a.

Evaluamos la reducción debido al pretratamiento con ARNasa a partir de la cuantificación por medio de TCID<sub>50</sub>, RT-qPCR y CRISPR-Cas13a. Para esto se usaron concentraciones virales de  $10^6, 10^4, 10^2$  y  $10^0$  cg/rxn pre expuestas a temperaturas de 5 °C, -20 °C, temperatura ambiente (control de detección) y 80 °C (control de inactivación térmica viral). El método de TCID<sub>50</sub> es un punto de comparación como ensayo de infectividad contra el método por RT-qPCR y CRISPR-Cas13a con ARNasa.

Mediante una detección de infectividad por TCID<sub>50</sub>, en la concentración 10<sup>6</sup> cg/rxn se obtuvieron reducciones de hasta 2 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml en el tratamiento a -20 °C mientras que a las alícuotas tratadas a 80 °C la reducción fue de 0.889 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. El control a 37 °C mostró una reducción de 0.415 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml siendo similar a la reducción obtenida con aquellas alícuotas tratadas a 5 °C, en donde la reducción fue de 0.556 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (Tabla 5).

Si bien mostraron un comportamiento similar en las concentraciones altas, en la concentración más bajas, es decir, 10<sup>0</sup> cg/rxn únicamente las alícuotas tratadas a 80°C mostró la mayor reducción del título viral con 0.467 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. Sin embargo, en este caso con respecto al control, las alícuotas tratadas a -20 °C mostraron un comportamiento similar con una reducción de ~0.130 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

En contraste con los resultados obtenidos en cultivo celular, utilizando RT-qPCR se observaron reducciones menores en las concentraciones más altas. Siendo en 10<sup>6</sup> cg/rxn con las alícuotas tratadas a -20 °C una reducción de 0.798 log<sub>10</sub> cg/ml mientras que aquellas tratadas a 80 °C mostraron una reducción de 0.596 log<sub>10</sub> cg/ml. Las alícuotas usadas como control, así como las tratadas a 5 °C mostraron reducciones similares de ~0.200 log<sub>10</sub> cg/ml. A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre TCID<sub>50</sub> y RTq-PCR a excepción de las concentraciones 10<sup>6</sup> cg/rxn (Tabla 6).

Las concentraciones menores (10<sup>0</sup> cg/rxn y 10<sup>2</sup> cg/rxn) además de mostrar notable detección superior a la técnica celular expuestas a tratamientos, así como entre alícuotas tratadas y no tratadas con ARNasa, se observaron mayores reducciones de los títulos virales. En el tratamiento dado a 5 °C en la concentración de 10<sup>4</sup> y 10<sup>0</sup> cg/rxn se observó 0.811 log<sub>10</sub> cg/ml y 1.385 log<sub>10</sub> cg/ml de reducción siendo estos valores mayores con respecto al control, 0.574 log<sub>10</sub> cg/ml y 0.391 log<sub>10</sub> cg/ml respectivamente. En la concentración 10<sup>0</sup>, la alícuota tratada a 80 °C mostró menor reducción en comparación con las otras concentraciones realizadas.

La cuantificación por RT-qPCR mostró un patrón con reducciones generalmente menores a 1 log, salvo en casos puntuales. En la dilución más alta (10<sup>6</sup> cg/rxn), las disminuciones fueron de 0.20 log<sub>10</sub> cg/ml a 37 °C; 0.22 log<sub>10</sub> cg/ml a 5 °C; 0.80 log<sub>10</sub> cg/ml a -20 °C y 0.60 a 80 °C. En la dilución intermedia (10<sup>4</sup> cg/rxn), las pérdidas se incrementaron ligeramente,

alcanzando hasta  $1.07 \log_{10}$  cg/ml a  $80^{\circ}\text{C}$ , mientras que a las otras temperaturas los valores se mantuvieron entre 0.57 y  $0.81 \log_{10}$ . Para  $10^2$  cg/rxn, las reducciones permanecieron en niveles bajos, con un rango de 0.07 a  $0.65 \log_{10}$  cg/ml. Finalmente, en la dilución más baja ( $10^0$  cg/rxn), el método registró las reducciones más altas observadas en esta técnica, llegando a  $1.39 \log_{10}$  cg/ml a  $5^{\circ}\text{C}$ , aunque en el resto de las condiciones las pérdidas fueron moderadas ( $0.39 - 0.72 \log_{10}$  cg/ml). En conjunto, estos resultados evidencian que RT-qPCR presenta variaciones más contenidas entre diluciones, con incrementos moderados en condiciones específicas.

El desempeño del método CRISPR-Cas13a mostró variaciones claras dependiendo tanto de la dilución como de la temperatura de almacenamiento. En la dilución  $10^6$  cg/rxn, se observó reducciones notables, con una disminución de  $9.971 \log_{10}$  cg/ml a  $5^{\circ}\text{C}$ , mientras que, a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$  las reducciones fueron comparables ( $2.728$ ,  $1.503$  y  $0.371 \log_{10}$  cg/ml, respectivamente). Esta misma tendencia se modificó en diluciones intermedias: a  $10^4$  cg/rxn, la pérdida de señal fue mucho menor, con reducciones menores a  $1 \log_{10}$  cg/ml en la mayoría de las condiciones ( $0.587 \log_{10}$  cg/ml a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $0.082 \log_{10}$  cg/ml a  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $0.456 \log_{10}$  cg/ml a  $80^{\circ}\text{C}$ ). En concentraciones más bajas ( $10^2$  y  $10^0$  cg/rxn), el comportamiento fue más heterogéneo, aunque las reducciones se mantuvieron en un rango menor de  $1 \log_{10}$  cg/ml. Para  $10^2$  cg/rxn, los valores oscilaron entre 0.09 y  $1.089 \log_{10}$  cg/ml destacando un valor negativo poco contundente a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $-0.019 \log_{10}$  cg/ml). Para  $10^0$  cg/rxn se registraron reducciones de hasta  $0.978 \log_{10}$  cg/ml (a  $37^{\circ}\text{C}$ ), junto con variaciones cercanas a cero en otras condiciones ( $-0.047 \log_{10}$  cg/ml a  $5^{\circ}\text{C}$ ).

En conjunto, estos resultados ilustran que el método basado en CRISPR-Cas13a logra detectar reducciones más marcadas en altas concentraciones iniciales y bajo ciertas temperaturas (particularmente a  $5^{\circ}\text{C}$  en  $10^6$  cg/rxn), mientras que en diluciones bajas las diferencias se atenúan y la respuesta se vuelve más variable. En el análisis estadístico de esta técnica en comparación con la  $\text{TCID}_{50}$  y RT-qCPR, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todas las concentraciones en las alícuotas tratadas a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$  aun cuando se trataba enzimáticamente con ARNasa.

Tabla 5. Cuantificación de MNV-1 por TCID<sub>50</sub>, RT-qPCR y CRISPR-Cas13a antes y después del pretratamiento enzimático con ARNasa y tratamiento térmico.

Conc. (cg/rxn)	Tratamiento térmico	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml)			RT-qPCR (log <sub>10</sub> cg/ml)			CRISPR-Cas13a (log <sub>10</sub> cg/ml)		
		Virus intacto	Virus pretratado	Reducción logarítmica	Virus intacto	Virus pretratado	Reducción logarítmica	Virus intacto	Virus pretratado	Reducción logarítmica
10 <sup>6</sup>	37°C	5.936 ± 0.263	5.521 ± 0.063	0.415	7.976 ± 0.082	7.771 ± 0.137	0.206	9.392 ± 1.875	6.664 ± 0.850	2.728
	-20°C	7.668 ± 0.047	5.617 ± 0.211	2.051	7.719 ± 0.123	6.921 ± 0.449	0.798	8.020 ± 2.520	6.517 ± 2.184	1.503
	5°C	6.812 ± 0.015	6.256 ± 0.094	0.556	8.100 ± 0.017	7.879 ± 0.204	0.221	14.708 ± 1.627	4.737 ± 0.022	9.971
	80°C	4.784 ± 0.574	3.895 ± 0.683	0.889	7.663 ± 0.132	7.067 ± 0.022	0.596	9.671 ± 2.811	9.300 ± 4.497	0.371
10 <sup>4</sup>	37°C	4.776 ± 0.289	4.455 ± 0.109	0.321	5.266 ± 0.446	4.692 ± 0.089	0.574	6.481 ± 1.550	5.894 ± 0.978	0.587
	-20°C	6.483 ± 0.450	5.344 ± 0.296	1.139	5.199 ± 0.019	4.579 ± 0.120	0.620	6.451 ± 1.647	5.603 ± 2.198	0.848
	5°C	5.444 ± 0.112	4.649 ± 0.493	0.795	5.151 ± 0.360	4.340 ± 0.349	0.811	4.584 ± 0.002	4.502 ± 0.015	0.082
	80°C	3.589 ± 0.221	2.995 ± 0.118	0.594	4.651 ± 1.347	3.575 ± 0.367	1.076	8.718 ± 2.330	8.262 ± 3.183	0.456
10 <sup>2</sup>	37°C	3.656 ± 0.314	3.264 ± 0.052	0.392	4.439 ± 0.250	3.738 ± 0.311	0.701	6.135 ± 1.283	5.045 ± 0.516	1.089
	-20°C	4.918 ± 0.149	4.581 ± 0.105	0.337	4.133 ± 0.290	3.536 ± 0.188	0.653	5.530 ± 0.804	5.549 ± 1.767	-0.019
	5°C	4.411 ± 0.185	4.107 ± 0.118	0.304	4.072 ± 0.337	3.799 ± 0.340	0.274	4.444 ± 0.039	4.352 ± 0.031	0.091
	80°C	3.107 ± 0.275	2.884 ± 0.039	0.222	3.629 ± 0.020	2.993 ± 0.001	0.635	7.185 ± 1.117	6.733 ± 2.041	0.452
10 <sup>0</sup>	37°C	2.995 ± 0.039	2.362 ± 0.699	0.139	3.573 ± 1.013	3.183 ± 0.424	0.391	5.642 ± 1.407	4.664 ± 0.354	0.978
	-20°C	3.641 ± 0.088	3.468 ± 0.000	0.173	3.064 ± 0.013	2.339 ± 0.030	0.724	5.096 ± 1.000	4.812 ± 1.535	0.284
	5°C	3.162 ± 0.196	2.912 ± 0.079	0.250	3.809 ± 0.398	2.425 ± 0.205	1.385	4.308 ± 0.129	4.355 ± 0.011	-0.047
	80°C	2.334 ± 0.660	1.867 ± 0.000	0.467	3.294 ± 0.229	2.683 ± 0.194	0.611	6.552 ± 0.806	5.951 ± 1.440	0.601

Conc. (cg/rxn) = Concentración de MNV-1, log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro.

Tabla 6. Diferencias estadísticas entre TCID<sub>50</sub>, RT-qPCR y CRISPR-Cas13a tratados bajo condiciones térmicas.

T°	Técnica	MNV-1 (cg/rxn)			
		10 <sup>0</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
37°C	CRISPR-Cas13a/ RT-qPCR	0.0043/ns	0.0248/ns	ns/ns	ns/ns
	CRISPR-Cas13a/TCID <sub>50</sub>	0.0002/0.0012	0.0004/0.0170	0.0238/ns	0.0001/ns
	RT-qPCR/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	0.0049/0.0016
-20°C	CRISPR-Cas13a/ RT-qPCR	0.0052/0.0005	ns/0.0057	ns/ns	ns/ns
	CRISPR-Cas13a/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	ns/ns
	RT-qPCR/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	0.0001/ns
5°C	CRISPR-Cas13a/ RT-qPCR	ns/ns	ns/ns	ns/ns	0.0001/0.0019
	CRISPR-Cas13a/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	0.0001/ns
	RT-qPCR/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	ns/0.0336
80°C	CRISPR-Cas13a/ RT-qPCR	0.0001/0.0001	0.0001/0.0001	0.0001/0.0001	0.0058/0.0018
	CRISPR-Cas13a/TCID <sub>50</sub>	0.0001/0.0001	0.0001/0.0001	0.0001/0.0001	0.0001/0.0001
	RT-qPCR/TCID <sub>50</sub>	ns/ns	ns/ns	ns/ns	0.0001/0.0001

T° = Tratamiento térmico, cg/rxn = copias genómicas por reacción, ns = sin diferencia significativa, valor posterior a / = valor bajo tratamiento de ARNasa.

#### 7.6 Impacto de la temperatura en el título viral de MNV-1.

La exposición de las distintas concentraciones de MNV-1 a tratamientos de temperatura (80 °C, 37 °C, 5 °C y -20 °C) mostró diferencias en la detección entre las distintas técnicas. Los títulos virales cuantificados por TCID<sub>50</sub> mostraron títulos superiores en comparativa al control a excepción de las tratadas a 80 °C, donde la mayor disminución de título viral fue 1.187 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml en la concentración 10<sup>4</sup> cg/rxn. En los tratamientos a 5 °C y -20 °C se observaron valores que iban desde 0.167 hasta 1.732 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml en todas las concentraciones virales probadas denotando una mayor preservación del virus a bajas temperaturas (Figura 4.A).

A diferencia de la TCID<sub>50</sub>, los datos obtenidos mediante RT-qPCR mostraron mayor sensibilidad cuantificable al obtener títulos virales superiores mostrando un comportamiento contrario al obtenido en la técnica celular, siendo estos en su mayoría cercanos a los títulos del control. La mayor diferencia de título viral observada fue en las alícuotas tratadas a 80 °C siendo estas superiores a 0.279 log<sub>10</sub> cg/ml en las concentraciones muestreadas similar a lo obtenido en las alícuota tratadas a -20 °C donde

se mostró mayor disminución en las concentraciones menores respecto al control (Figura 4.B).

En CRISPR-Cas13a, se observaron diferencias en los títulos virales con respecto a lo cuantificado mediante RT-qPCR y TCID<sub>50</sub>, encontrando valores que se aumentaban hasta 2 veces con respecto al control en el tratamiento térmico aplicado a 80 °C. Excepcionalmente la concentración 10<sup>0</sup> cg/rxn donde hubo un aumento de 0.910 log<sub>10</sub> cg/ml con respecto al control. Las alícuotas tratadas a 5 °C y -20 °C no mostraron aumentos con respecto al control, sino que disminuye a la par de la concentración (Figura 4.C).

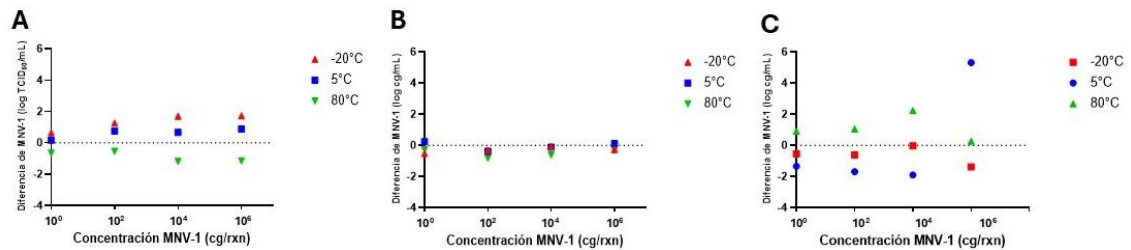


Figura 4. Diferencia en comparación del control (37°C) entre valores obtenidos en los diferentes tratamientos térmicos tratamiento sin ARNasa A) en TCID<sub>50</sub>, B) en RT-qPCR y C) en CRISPR-Cas13a. log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID<sub>50</sub>/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro.

Cuando se aplicó el tratamiento enzimático con ARNasa se observaron tendencias similares a las mostradas con las alícuotas no tratadas enzimáticamente. En TCID<sub>50</sub>, los títulos virales mantuvieron mayor reducción con respecto al control en las alícuotas tratadas a 80 °C. En ese caso puede observarse el aumento gradual en la diferencia de título viral conforme aumenta la concentración siendo el valor máximo de 1.626 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml en la concentración 10<sup>6</sup> cg/rxn (Figura 5.A).

En RT-qPCR, la tendencia igualmente se mantuvo teniendo valores por debajo del control en todas las alícuotas tratadas térmicamente. A 80 °C se observó la mayor diferencia en títulos virales a excepción de la concentración 10<sup>0</sup> y 10<sup>6</sup> cg/rxn en las que las alícuotas tratadas a -20 °C mostraron mayor diferencia con valores cercanos a ~1 log<sub>10</sub> cg/ml (Figura 5.B). El título viral de las alícuotas tratadas a 5 °C no mostró gran diferencia con respecto al control teniendo diferencias menores a 0.199 log<sub>10</sub> cg/ml mostrando la estabilidad del virus en esta temperatura similar a como se observa en la técnica celular.

Con respecto a CRISPR-Cas13a, las diferencias entre el tratamiento a 80 °C y control mantuvieron la tendencia de aumentar hasta 2 veces los títulos virales; así como la decreciente diferencia conforme aumenta la concentración de MNV-1 observado en las alícuotas tratadas a 5 °C. En aquellas alícuotas tratadas a -20 °C se observó una tendencia similar a las otras técnicas, presentándose como títulos virales cercanos al control (Figura 5.C).

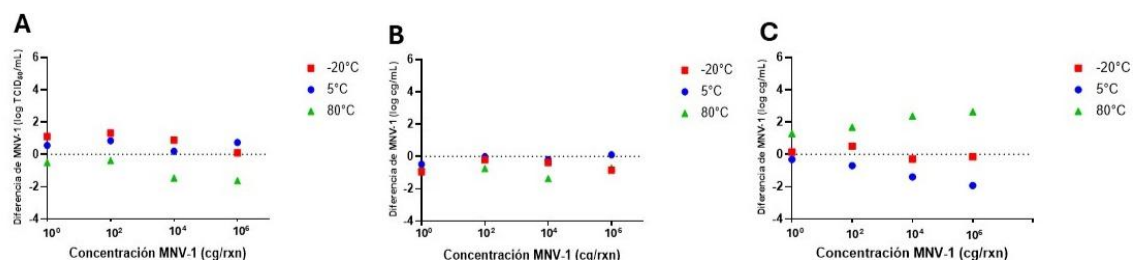


Figura 5. Diferencia en comparación del control (37°C) entre valores obtenidos en los diferentes tratamientos térmicos sin tratamiento con ARNasa A) en TCID<sub>50</sub>, B) en RT-qPCR y C) en CRISPR-Cas13a. log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID<sub>50</sub>/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro.

### 7.7 Relación de linealidad en la detección de partículas infectivas entre TCID<sub>50</sub> y técnicas moleculares.

Una vez cuantificado el MNV-1 mediante la técnica celular (TCID<sub>50</sub>) y las técnicas moleculares (RT-qPCR y CRISPR-Cas13a) se buscó la relación lineal mediante la correlación de Spearman en relación con la detección de MNV-1. De forma inicial, se encontraron buenas correlaciones con los datos obtenidos entre TCID<sub>50</sub> (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) y RT-qPCR (log<sub>10</sub> cg/ml) en los distintos tratamientos térmicos. El tratamiento a -20 °C mostró un coeficiente elevado ( $r = 0.936$ ) mostrando una muy alta correlación seguido de los datos tratados a 37°C ( $r = 0.754$ ).

Cuando se aplicó el análisis de correlación lineal a los datos tratados con ARNasa TCID<sub>50</sub> y RT-qPCR a razón de establecer la técnica con pretratamiento enzimático como parámetro de viabilidad, igualmente se mostró una fuerte correlación positiva con coeficientes  $r$  superiores a 0.873 en las temperaturas de 37 °C y -20 °C. Únicamente en los datos expuestos a 80 °C se tuvo un coeficiente  $r = 0.738$  que establece que hay una relación de correlación moderada. Estos altos coeficientes de correlación establecen la RT-qPCR como una técnica fiable en títulos virales y viabilidad cuando se trata o no con ARNasa (Figura 6).

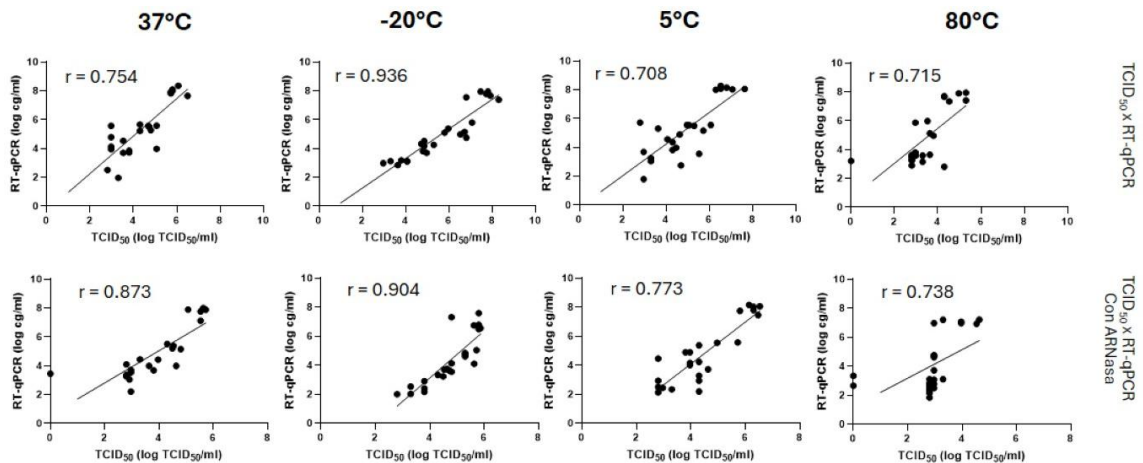


Figura 6. Análisis de correlación de Spearman para las técnicas de TCID<sub>50</sub> y RT-qPCR en los diferentes tratamientos térmicos. Imágenes superiores: ambas técnicas sin tratamiento de ARNasa, imágenes inferiores: TCID<sub>50</sub> sin tratamiento con ARNasa y RT-qPCR con tratamiento con ARNasa. log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID<sub>50</sub>/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro.

Por otro lado, el análisis de correlación obtenido entre TCID<sub>50</sub> (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) y CRISPR-Cas13a (log<sub>10</sub> cg/ml) mostró coeficientes  $r$  variantes cuando se trata o no con ARNasa. Los datos con tratamiento a 5 °C y -20 °C mostraron una correlación alta con  $r = 0.929$  y  $r = 0.596$  sin ARNasa así como  $r = 0.810$  a 5 °C y  $r = 0.764$  a 37 °C con ARNasa, mientras que los tratamientos a los que se les aplicó tratamiento enzimático o no en otras temperaturas mostraron de una baja a moderada correlación con coeficientes en rango de  $r = 0.347$  a  $0.593$ . Esto muestra una baja equivalencia entre los títulos (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml y log<sub>10</sub> cg/ml) obtenidos por ambas técnicas (Figura 7A).

Además, se buscó la linealidad entre ambas técnicas moleculares (log<sub>10</sub> cg/ml) encontrándose únicamente buen coeficiente de correlación  $r$  en los datos tratados a 37°C ( $r = 0.606$ ) como a 5°C ( $r = 0.881$ ). Al aplicar un análisis de Bland Altman, se encontró que en promedio CRISPR-Cas13a ofreció valores sesgo (bias) de 1.6 y 1.7. Estos valores responden a las veces que son más altos sus datos cuantificables que los datos de RT-qPCR en estos tratamientos, posiblemente sobreestimando así los títulos virales con esta técnica (Figura 7.B).

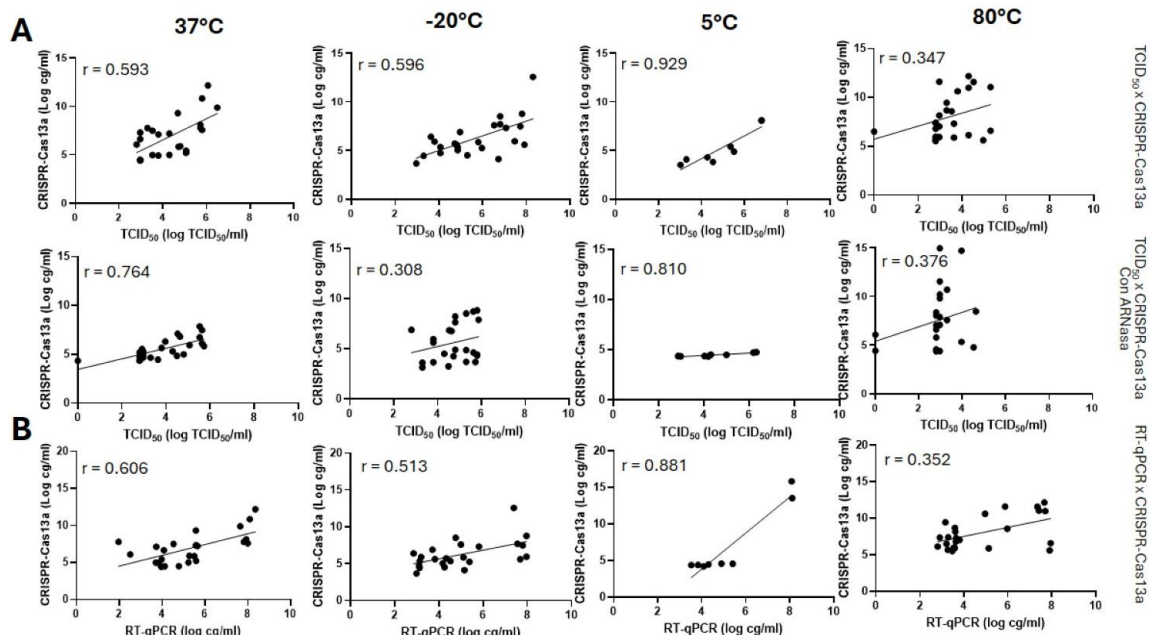


Figura 7. Análisis de correlación de Spearman para las técnicas de TCID<sub>50</sub> y CRISPR-Cas13a en los diferentes tratamientos térmicos. A) Imágenes superiores: ambas técnicas sin tratamiento de ARNasa, imágenes inferiores: TCID<sub>50</sub> sin tratamiento con ARNasa y CRISPR-Cas13a con tratamiento con ARNasa. B) entre técnicas moleculares sin tratamiento con ARNasa. log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID<sub>50</sub>/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro.

### 7.8 Equivalencia de detección entre TCID<sub>50</sub> y técnicas moleculares de partículas infectivas.

Con el fin de evaluar la capacidad de predicción/asertividad en temas de infectividad viral detectado por las técnicas moleculares (RT-qPCR y CRISPR-Cas13a) se buscó determinar una relación de equivalencia frente a TCID<sub>50</sub> con conversión en radios. Los radios obtenidos entre TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR (+) tratados a -20 °C mostraron los radios menores de 1:0.906 ± 0.050 en la dilución 10<sup>6</sup> cg/rxn y 1:0.644 ± 0.004 log<sub>10</sub> cg/ml en la dilución 10<sup>0</sup> cg/rxn contrario a el tratamiento a 37 °C con radios de 1:1.311 ± 0.024 log<sub>10</sub> cg/ml en la dilución 10<sup>6</sup> y 1.105 ± 0.155 log<sub>10</sub> cg/ml en la dilución 10<sup>0</sup> cg/rxn. Se observó además una tendencia a la baja conforme bajaba la concentración de MNV-1 en las 4 temperaturas (Tabla 6).

En cuanto a TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a (+), los radios permanecieron variables en los diferentes tratamientos térmicos y entre concentraciones de MNV-1 probadas. Si bien la mayoría fueron superiores a 1:0.695 log<sub>10</sub> cg/rxn con valores máximos de 1:2.385 a 80 °C contrario a lo observado en TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR, se observó que las concentraciones más bajas en los 3 tratamientos térmicos mantuvieron los radios mayores.

Cuando se buscó establecer la equivalencia en radios entre ambas técnicas moleculares (CRISPR-Cas13a: RT-qPCR) sin o con tratamiento con ARNasa, igualmente mostraron un aumento conforme disminuye la concentración de MNV-1. Los valores de proporción más pequeños fueron encontrados en el tratamiento a -20 °C sin ARNasa con  $1:0.622 \pm 0.086$  en  $10^0$  cg/rxn y tratado con ARNasa con  $1:0.602 \pm 0.019$  en  $10^6$  cg/rxn. Estos datos son similares a lo observado en cuanto el comportamiento lineal expresado en el análisis de Spearman.

Tabla 7. Relación entre TCID<sub>50</sub>-RT-qPCR-CRISPR-Cas13a por relación de equivalencia.

T°	MNV-1 (cg/rxn)	TCID <sub>50</sub> :RT-qPCR(+)	TCID <sub>50</sub> :CRISPR(+)	CRISPR:RT-qPCR	
		Radio (1 TCID <sub>50</sub> = log <sub>10</sub> cg/ml)	Radio (1 TCID <sub>50</sub> = log <sub>10</sub> cg/ml)	Radio (1 log <sub>10</sub> cg/ml = log <sub>10</sub> cg/ml)	
				ARNasa (-)	ARNasa (+)
37°C	10 <sup>6</sup>	1:1.311 ± 0.024	1:1.129 ± 0.216	1:1.175 ± 0.265*	1:0.859 ± 0.148
	10 <sup>4</sup>	1:1.036 ± 0.040	1:1.245 ± 0.326	1:1.236 ± 0.140	1:1.218 ± 0.375
	10 <sup>2</sup>	1:1.027 ± 0.025	1:1.403 ± 0.299	1:1.407 ± 0.303	1:1.378 ± 0.335
	10 <sup>0</sup>	1:1.105 ± 0.155	1:1.560 ± 0.124	1:1.853 ± 1.141	1:1.479 ± 0.364
-20°C	10 <sup>6</sup>	1:0.906 ± 0.050	1:0.857 ± 0.375	1:1.036 ± 0.299	1:0.957 ± 0.463
	10 <sup>4</sup>	1:0.708 ± 0.068	1:0.861 ± 0.291	1:0.858 ± 0.268	1:1.248 ± 0.529
	10 <sup>2</sup>	1:0.719 ± 0.017	1:1.124 ± 0.411	1:0.764 ± 0.064*	1:1.556 ± 0.537
	10 <sup>0</sup>	1:0.644 ± 0.004	1:1.347 ± 0.528	1:0.622 ± 0.086*	1:2.103 ± 0.829
5°C	10 <sup>6</sup>	1:1.162 ± 0.039	1:0.695 ± 0.005	1:1.864 ± 0.138*	1:0.602 ± 0.019
	10 <sup>4</sup>	1:0.874 ± 0.182	1:0.827 ± 0.020	1:0.991 ± 0.223	1:0.973 ± 0.223
	10 <sup>2</sup>	1:0.852 ± 0.131	1:0.988 ± 0.048	1:1.198 ± 0.112	1:1.173 ± 0.111
	10 <sup>0</sup>	1:0.900 ± 0.043	1:1.380 ± 0.089	1:1.545 ± 0.181	1:1.560 ± 0.140
80°C	10 <sup>6</sup>	1:1.489 ± 0.185	1:2.009 ± 1.158	1:1.271 ± 0.368	1:1.316 ± 0.624
	10 <sup>4</sup>	1:1.021 ± 0.211	1:2.385 ± 0.797	1:1.981 ± 0.183	1:2.392 ± 0.467
	10 <sup>2</sup>	1:0.973 ± 0.077 <sup>abc</sup>	1:2.171 ± 0.470	1:1.981 ± 0.351	1:2.430 ± 0.905
	10 <sup>0</sup>	1:0.759 ± 0.183 <sup>abc</sup>	1:1.764 ± 0.040	1:2.005 ± 0.379	1:2.260 ± 0.370

T° = Tratamiento térmico, MNV-1 (cg/rxn) = Concentración de MNV-1, TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR (+) = Datos TCID<sub>50</sub> sin ARNasa y datos RT-qPCR tratados, TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a (+) = Datos TCID<sub>50</sub> sin ARNasa y datos CRISPR-Cas13a tratados, log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml = logaritmo de TCID/ml, log<sub>10</sub> cg/ml = logaritmo de copias genómicas por mililitro; ARNasa (-) = Datos de ambas técnicas sin tratamiento con ARNasa, ARNasa (+) = Datos de ambas técnicas con tratamiento de ARNasa. <sup>a</sup> = Diferencia significativa con corrección de False Discovery Rate por Benjamini–Hochberg entre radios TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR y TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a, <sup>b</sup> = Diferencia significativa con corrección de Bonferroni entre proporciones/relaciones TCID<sub>50</sub>:RT-qPCR y TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a, <sup>c</sup> = Diferencia significativa con corrección de Holm-Bonferroni entre radios TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR y TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a; \* = Diferencia significativa entre las muestras ARNasa (+) y ARNasa (-).

## 8. DISCUSIÓN

El norovirus, virus entérico que según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC; 2024) es responsable del 58 % de los brotes epidemiológicos con cuadro gastrointestinal a nivel mundial. Ha logrado posicionarse como prioridad en los sistemas de seguridad alimentaria de forma rutinaria sólo en países industrializados (Bosch *et al.*, 2018; Cook *et al.*, 2016). Con métodos acreditados por parte de la ISO y la FDA en donde la RT-qPCR es el método estándar dado su alta sensibilidad y especificidad, ésta presenta la desventaja frente a otros métodos al no ser práctica económicamente para la industria (Zaczek *et al.*, 2021).

Aun con el desarrollo de nuevas técnicas que cubran las limitantes como tiempos de detección y rentabilidad, el interés actual reside en la discriminación de partículas virales infectivas/intactas de partículas virales dañadas y/o ARN libre (Shah y Hall, 2019). Dicha problemática se ha tratado de resolver innovadoramente mediante la combinación de la RT-qPCR con pretratamientos. Algunos agentes químicos usados como intercalantes de ADN son monoazida (PMA, EMA y PMAxx) y el cloruro de platino (PtCl<sub>4</sub>). Además, se han aplicado tratamientos de inmunocaptura (PGM-MB, ISC-RT-qPCR) para concentrar los virus, así como tratamientos enzimáticos con ARNasas y/o Proteinasa K (Rodríguez *et al.*, 2009; Wales *et al.*, 2024). Recientemente, se ha implementado el uso de enteroides intestinales humanos. Este método facilita la detección y estudio del HuNoV sin usar subrogados, sin embargo, aún no está bien establecido (Randazzo, 2025).

El uso de MNV-1 como subrogado en este proyecto se estableció de acuerdo a Sherman *et al.*, (2025). Este modelo genético es el más adecuado hasta el momento en la investigación de HuNoV debido a la facilidad de propagación que permite la obtención de títulos virales altos en poco tiempo, a comparación de otros. Además, Bae y Schwab (2007) mencionan que este subrogado presenta similitudes de comportamientos en la persistencia e inactivación cuando se le aplican tratamientos desinfectantes y de conservación. Siendo aquellos productos que se usan de forma común en la industria de los alimentos contra microorganismos de origen bacteriano.

Por otro lado, la estandarización de la RT-qPCR en nuestro proyecto permitió la detección y cuantificación de  $10^7$  a  $10^0$  cg posterior a la obtención de la ecuación de la recta con una  $R^2=0.999$ . En ese caso usamos los oligonucleótidos establecidos por la FDA, los cuales mostraron buena sensibilidad y una eficiencia del 102.15 %. No obstante, otras investigaciones como la de Baert *et al.* (2007) identificaron una  $R^2$  de 0.99, usando el plásmido p20.3. Dicho plásmido contiene un clon completo de ADNc de MNV-1.CW1, en el cual, usando oligonucleótidos diseñados por ellos, pudieron cuantificar desde  $10^7$  hasta  $10^1$  cg. La detección de  $10^0$  cg no fue detectada en sus múltiples repeticiones, mencionando aun así que su técnica es robusta y sensible con una eficiencia del 97.38 %.

No obstante, Kitajima *et al.*, (2010) usando MNV-1 cultivado y oligonucleótidos de la FDA, obtuvieron una  $R^2$  de 0.999. Sin embargo, la eficiencia fue de 96.76 % que si bien mantuvo un alto rendimiento cuantitativo ( $10^8$  a  $10^0$  cg totales) al comparar su RT-qPCR usando un plásmido solo pudieron cuantificar de  $10^9$ - $10^1$  cg totales. Según Vashist *et al.*, (2012) esto puede deberse a problemas de eficiencia de la enzima RT que afecta la detección a bajas concentraciones de ARN, así como también los tiempos de incubación. A diferencia de lo establecido con la BAM, los ciclos aplicados fueron menores, así como los tiempos y las temperaturas de alineamiento/extensión.

En cuanto la estandarización de  $TCID_{50}$  realizada mediante la aparición de efecto citopático (CPE) de las concentraciones de MNV-1 permitió establecer la concentración de virus con cápside intacta presente en las alícuotas propagadas. En general, Smither *et al.*, (2013) mencionan que esta técnica es preferible a la técnica en placa (PFU), donde la presencia de una capa semisólida restringe la capacidad de unión del virus a las células, aun cuando esta última necesita menos tiempo y su objetivo es cuantitativo. No obstante, al obtener títulos virales menores a lo obtenido por RT-qPCR, se atribuye a las desventajas de la  $TCID_{50}$  basadas en la subjetividad de interpretación del CPE, la susceptibilidad de las células al virus y al propio virus (Kitajima *et al.*, 2010).

En cuanto a CRISPR-Cas13a, con un LOD de  $5.642 \log_{10}$  cg/rxn y un “time to threshold” promedio de  $\sim 5$  min, se podría decir que la reacción de detección con el sistema CRISPR-Cas es rápida y efectiva. No obstante, otros proyectos como el de Duan *et al.*, (2022) y Ossio *et al.*, (2025) encontraron usando el mismo sistema con Cas13a para

HuNoV GII.4 y MNV-1 un LOD de 5 cg/rxn e igualmente tuvieron un tiempo de detección efectiva de fluorescencia a los 5 min en el caso de Duan.

Al evaluar la posibilidad de reactividad cruzada con otros blancos se descartó frente a HuNoV GI.5 y HAV. De acuerdo con Ossio *et al.*, (2025) que usaron blanco sintético de estos virus y Duan *et al.*, (2022) quienes probaron con diversos genotipos de HuNoV y otros virus entéricos no encontrando reactividad, a excepción de una cepa de GII.4 de HuNoV. Esto confirma la importancia y asertividad que se tuvo en el diseño del gARN, limitando el corte en la secuencia blanco de MNV-1. En este caso el diseño depende del rendimiento de la detección aun cuando se aplique uno o múltiples gARN (Mohr *et al.*, 2016). Aunque nuestro LOD es elevado en comparativa con otros, Khosla *et al.*, (2025) incita a que las tecnologías CRISPR sean usadas mientras el enfoque se mantenga en la discriminación de señales positivas de baja señal en comparación con los negativos.

El uso de pretratamientos enzimáticos para la detección real de infectividad viral presente en diversas muestras de alimentos y tratamientos se ha mantenido en investigación. El presente proyecto mostró que la adición de un pretratamiento enzimático con 20 U de ARNasa ONE reduce el título viral de MNV-1 hasta del 80.76 % cuando el virus está a  $10^6$  cg/rxn. No obstante, Li *et al.*, (2009) usando 10 ng de ARNasa A e incubando durante 30 min obtuvo un 100 % de reducción cuando se aplicaba directamente a ARN viral de MNV-1. En cambio, aplicando las mismas condiciones a MNV-1 cultivado, obtuvieron resultados de detección positivos. Contrario, si se combinaba con 40 U Proteinasa K la eficacia de esta combinación enzimática fue de una reducción total.

Posteriormente Li *et al.*, (2012) demostraron diferencias entre diversas técnicas. Usando ARN viral tratado con 10 U ARNasa ONE por 15 min obtuvieron un 8.80 % de reducción de MNV-1 en la cuantificación con RT-qPCR. Cuando aplicaron el método RT-qPCR con unión a células (Cell binding RT-qPCR) usando virus cultivado con pretratamiento la reducción fue del 98.44%. Estas diferencias entre técnicas se sugiere podría ser debido a modificación de los dominios P. Sherman *et al.* (2025) describe que estos dominios se vuelven flexibles conformando la cápside en forma “apo”, cerrando su posible unión a receptores.

Oristo *et al.*, (2018) realizó la comparativa entre PMAxx (100  $\mu\text{mol/L}$ ), benzonasa (100 U) y ARNasa bovina (4 U) en ARN viral intacto de rotavirus y NoV, para identificar su acción sobre la viabilidad/infectividad. Los resultados mostraron que PMAxx reduce hasta 1.31  $\log_{10}$  gc en ambos virus intactos. Cuando se usó enzimas como la benzonasa en presencia de ARN viral libre se observó total reducción; sin embargo, el uso de virus intacto sólo permitió la reducción de 0.76  $\log_{10}$  gc en NoV, sin efecto en rotavirus. Cuando se usó ARNasa en presencia de ARN viral libre, se redujo 0.46  $\log_{10}$  cg y 0.51  $\log_{10}$  cg en NoV y rotavirus respectivamente. Estas diferencias entre tratamientos dicen se deben a posibles inhibidores o condiciones de las técnicas aplicadas.

Igualmente, Raymond *et al.*, (2023) usando HuNoV compararon la tasa de recuperación del virus eludido a partir del PEG (metodología ISO 15216-1:2017) aplicando ARNasa ONE (40 U),  $\text{PtCl}_4$  (2.5 mM) y PMAxx (100  $\mu\text{M}$ ) de forma individual. Entre los diversos tratamientos la ARNasa ONE (60 $\pm$ 18 %) mostró mayor rendimiento de recuperación, seguido del cloruro de platino ( $\text{PtCl}_4$ ) con un 26 $\pm$ 16 % y finalmente, el PMAxx (23 $\pm$ 26 %). Si bien con estos datos se observa una clara mejora en la reducción con la adición de PMAxx a comparación de la ARNasa ONE, se sugiere que esto podría ser debido un exceso de ARNasa y a la posibilidad de que la matriz de la muestra no estaba libre de ARNasa y/o que no había ARN libre.

En este estudio se realizó la detección de partículas virales infecciosas utilizando 3 técnicas. Después de aplicar un pretratamiento enzimático con 20 U de ARNasa posterior a los diversos tratamientos térmicos se observó reducciones  $< 2.7 \log_{10}$  en presencia de una concentración viral de  $10^6$  cg/rxn.  $\text{TCID}_{50}$  y RT-qPCR utilizando 80°C de temperatura de inactivación viral mostró mayor reducción ( $>1 \log_{10}$ ) en comparación al tratamiento de -20°C en algunos casos.

Li *et al.*, (2012) cuantificaron HuNoV mediante RT-qPCR sin/con ARNasa ONE y RT-qPCR unido a células y obtuvieron reducciones  $< 2 \log_{10}$ . Observando poca eficiencia del pretratamiento, expusieron VLP y partículas P de HuNoV GII.4 a tratamientos térmicos severos (70°C / 10min y 85°C / 2min). Las partículas mostraron ser más estables y tenían menor reducción en que si se exponía el virus cultivado y/o ARN libre. Esto

debido a la posibilidad de que la ARNasa innata del lisado celular eliminaran el ARN libre o efectos protectores de la matriz del virus (SFB, glucosa y medio de cultivo).

Leblanc *et al.* (2019) expusieron MNV-1 y otros virus a 21°C, 4°C y -20°C demostrando que en general MNV-1 presenta ninguna o poca reducción en temperaturas de refrigeración (4°C) y de congelamiento (-20°C). Sin embargo, obtuvieron una reducción de hasta 2 log<sub>10</sub> cg/ml al exponer el virus a ARNasa A (10 ug/ml) en agua embotellada y de 0.69 log<sub>10</sub> gc/ml en arándanos frescos durante 1h. No obstante, mencionan que la mayoría de los HuNoVs y otros virus entéricos suelen presentar cierta estabilidad a esas temperaturas, sin descartar la posibilidad de pérdida de ARN propias de la técnica (embotellado/frutillas).

Por otra parte, Fang *et al.*, (2023) usando CRISPR-Cas12a, un sistema similar al usado en nuestro estudio, donde se necesita ADNdc con diseño y corte distinto, para detectar y cuantificar HuNoV en muestras clínicas obtuvieron un LOD de 10 cg/ul para GI y 1 cg/ul para GII. Esto fue consistente con su diseño de RT-qPCR, que en 35 min es capaz de detectar resultados positivos y negativos de forma cuantitativa como cualitativa bajo luz UV.

Similar, Fozouni *et al.*, (2021) diseñando un sistema Cas13a para detección de SARS-CoV-2 de 30 min con un LOD de 100 cg/ul pudo establecer su curva estándar y con ello cuantificar diversas muestras. Cuando compararon la cuantificación de muestras por RT-qPCR y CRISPR dio señales (cg/ul) mayores por la primera técnica. Esto se debe a que los valores de CRISPR-Cas están basados en el diseño de diversos ARNcr, por lo que la cuantificación y detección depende de la mejora del diseño y/o de la optimización de la proteína Cas13a.

A la vez, con la técnica de CRISPR-Cas13a en los tratamientos a 5°C y -20°C se observó en algunos casos nula reducción de MNV-1 cuando se pre-trató con ARNasa; similar a lo obtenido por Ossio *et al.* (2025) quienes establecieron como posible causa la “inexactitud” propia de la ARNasa ONE para degradar totalmente ARN libre. Gao *et al.*, (2025) sugiere que se debe a la capacidad inexacta de trans-escisión del blanco por parte

del sistema CRISPR-Cas13a. Además, Liu *et al.*, (2022) menciona puede ser bloqueada o no fácilmente con concentraciones críticas de  $Mg^{2+}$ .

En general, la reducción viral obtenida a partir de la aplicación de los diversos tratamientos para discriminación de infectividad viral no es equivalente a la efectividad del método. Se conoce que este depende de las partículas infectivas contenidas en la muestra, las cuales siempre serán desconocidas y, por lo tanto, inconcluyente (Raymond *et al.*, 2023). Además, reducciones del 99.99% solo se han obtenido posterior a la exposición a 10 ug/ml de ARNasa A, combinado con inactivación térmica a 95°C durante 1 h seguido de 30 min bajo radiación UV-C (Marti *et al.*, 2017). Con esto surge la idea de que la ARNasa puede mostrar mayor actividad cuando el fragmento de ARN libre es largo. Razafimahefa *et al.* (2021) demostraron esto obteniendo eficientes reducciones en fragmentos de amplificación con 159 pb que con fragmentos de 70 pb.

En nuestro estudio la resistencia de la cápside de MNV-1 frente a los tratamientos térmicos (-20 °C, 5 °C y 80 °C) en comparación al tratamiento control (37 °C) se mostró diferentes tendencias en presencia o no de ARNasa. En comparativa, la detección viral mediante TCID<sub>50</sub> y CRISPR-Cas13a sin ARNasa fue mayor a -20 °C y 80°C respectivamente. Por otro lado, la RT-qPCR se mantuvieron con valores muy cercanos al control en las diversas concentraciones y tratamientos de temperaturas.

La importancia en la aplicación de tratamientos de congelación reside en la manera en la que la mayoría de los alimentos con presencia de HuNoV son conservados. Kim *et al.* (2025) analizaron el comportamiento de MNV-1 en bayas ante la exposición a -20, -80 o -196 °C, obteniendo reducciones de hasta 3.2 log<sub>10</sub> cuando congelaron por tiempos largos (48 h a 2 años). En general cuando se trabaja con virus sin matriz alimentaria esto resultaría en poca o ninguna disminución de los títulos virales debido al efecto crioprotector que se atribuye a la rigidez estructural de la cápside. De Witt *et al.*, (2024) afirma que este efecto se llama hielo I y hielo II que ocurre a 5°C y -20°C respectivamente y ocurre aun cuando el virus se encuentra en medio isotónico (0.15 M). En nuestro caso no es raro que a esta temperatura se haya detectado mayor título viral a partir de diluciones seriadas a diferencia de los otros tratamientos que requieren calor (37°C y 80°C).

Evaluando la sensibilidad de detección de las técnicas moleculares realizadas basada en los datos obtenidos, se hipotetiza que la posible discrepancia entre títulos virales de RT-qPCR y CRISPR-Cas13a son propias de la técnica. JunZha *et al.*, (2025) observaron que la proteína Cas puede tener actividad inespecífica con pequeños fragmentos blanco, sugiriendo el uso de múltiples gARN o un guía de secuencia variable y otro de andamiaje. También Qian *et al.* (2020) identificaron que la adición de RT-RPA/eRPA mejora la eficiencia de detección frente al ADNc que se necesita en RT-qPCR, este último al no detectar muestras con  $<3$  cg ( $Ct >31$ ) mientras RT-RPA/eRPA era capaz de detectarlas eficientemente aún bajo tiras de flujo lateral (LFS).

La comparación entre títulos virales y sus distintas reducciones conlleva a establecer relación entre los métodos de detección realizados, así como también después de haber discriminado las partículas virales infectivas. El análisis de correlación realizados entre TCID<sub>50</sub> y RT-qPCR mostraron fuertes correlaciones entre TCID<sub>50</sub>/ml y cg/ml cuando se trató el virus a 37°C ( $r=0.754$ ) como a -20°C ( $r=0.936$ ). Además, cuando se buscó relación de linealidad de los datos tratados con ARNasa, todos mostraron un coeficiente de correlación  $r = >0.873$  a excepción de los datos tratados a 80°C ( $r=0.738$ ), que, al ser un control de inactivación era de esperarse.

Siendo estos métodos los más adecuados a la hora de cuantificar inóculos virales, la correlación entre ambas técnicas (TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR) no está descrita ampliamente. Sin embargo, Díez *et al.* (2011) no encontraron correlación en sus datos entre la RT-qPCR en combinación de Proteinasa K y ARNasa A (ET-RT-qPCR) y TCID<sub>50</sub>, con  $r = <0.00783$  tanto si aplicaban HPP, UV-C o calor. En relación con este proyecto y de acuerdo con ellos, se esperaría que la ARNasa no afectará la capacidad infectiva (cápside) del virus, manteniendo la linealidad y motivo por el cual se mantuvieron buenos coeficientes.

Shan *et al.* (2016) usando el virus de Tulane encontraron buena correlación entre PFU y TCID<sub>50</sub> ( $r = 0.85$ ) pero cuando correlacionan PFU: RTqPCR y después con ARNasa-RT-qPCR la linealidad fue pobre de  $r = 0.09$  y  $r = 0.22$ , respectivamente. Estos resultados son razonables con los de nosotros debido a que, de acuerdo con ellos, se debe a la discrepancia entre los múltiples datos obtenidos en los diferentes tratamientos. Esto observado al intentar correlacionar TCID<sub>50</sub> con CRISPR-Cas13a donde ambas técnicas

mostraron una linealidad con coeficientes de  $r = <0.764$  en todos los tratamientos a excepción del tratado con ARNasa a 5°C ( $r = 0.810$  y  $0.929$ ).

Por otro lado, en la búsqueda de comparación entre cuantificación de ambas técnicas moleculares, únicamente a 37°C ( $r = 0.606$ ) y a 5°C ( $r = 0.881$ ) se obtuvieron correlaciones positivas considerable y muy fuertes respectivamente. Esto similar a Fozouni *et al.*, (2021), quienes obtuvieron una fuerte correlación positiva ( $r = 0.996$ ) entre las pendientes de sus datos de RT-qPCR y CRISPR-Cas13a en la cuantificación de SARS-CoV-2. Igualmente, Rauch *et al.* (2020) con su sistema CRISPR-Cas13a OP-CREST frente la RT-qPCR recomendada en la CDC para detección de SARS-CoV-2. Con coeficiente  $r = 0.584$  usando de blanco la nucleocápside N1 y  $r = 0.811$  para la nucleocápside N2, sugieren que su método es confiable, robusto y con buen rendimiento. Aun cuando el blanco N1 presentó baja correlación debido a que no daría lugar a un falso negativo teniendo su sistema gARN múltiplex (Wang *et al.*, 2021).

Para buscar relación en la predicción de la infectividad entre TCID<sub>50</sub>/ml y cg/ml de ambas técnicas moleculares se establecieron relaciones de equivalencia (radios) entre técnicas. En comparativa entre los distintos tratamientos térmicos aplicados, se observaron radios decrecientes en las concentraciones 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup> cg/rx pero que aumentaban conforme disminuye la concentración. Mirmahdi *et al.*, (2025) relacionaron PFU: RT-qPCR con y sin ARNasa usando el virus de Tulaine, obteniendo en promedio que 1 PFU equivale a 5.250 log<sub>10</sub> cg, una cifra elevada incluso en nuestro estudio debido a lo que ellos mencionan la disparidad de los datos. En su caso PFU y nosotros con TCID<sub>50</sub>, sugiere que es debido a la sobreestimación en la detección por las técnicas moleculares y, en su caso, a la matriz muestra que inhibe su técnica.

La comparativa entre CRISPR-Cas13a: RTqPCR, en su mayoría los datos tratados con ARNasa mostraron mayores valores de equivalencia que los no tratados enzimáticamente. Algo inesperado que indica son métodos poco comparables tal como se demostró en la correlación de Spearman y en el análisis de Altman en el que se establece que CRISPR era casi 2 veces más elevado que RT-qPCR.

Contrario a esto, Shan *et al.*, (2016) a pesar de tener problemas para correlacionar la linealidad en sus técnicas, lograron encontrar una relación proporcional entre PFU y PGM-ISC-RT-qPCR. Su análisis determinó que por cada virus infectivo detectado por PFU había  $0.05 \log_{10}$  cg, dejando como conclusión que no presentaron inhibidores y que su método de inactivación (100 U ARNasa I) se deshizo correctamente de fragmentos de ARN y cápsides dañadas. Sin embargo, Nakaya *et al.*, (2020) menciona un valor tan pequeño podría equivaler a deficiencias técnicas en la RT-qPCR y/o a problemáticas del cultivo viral como la agregación del virus o la presencia de VLP que reducen la infectividad en TCID<sub>50</sub>.

## 9 CONCLUSIÓN

La estandarización entre técnicas moleculares mostró mayor eficiencia y sensibilidad en RT-qPCR (LOD 10 cg totales; 102.15 %) que con CRISPR-Cas13a (LOD  $1.08 \times 10^4$  cg totales; 3.2 %). Tanto RT-qPCR como CRISPR-Cas13a no presentan reactividad cruzada frente a otros blancos virales similares.

Por otro lado, la efectividad de la ARNasa mostró reducciones de detección de hasta el 80.76% cuando se aplicaba en ARN desnudo. Así mismo, las técnicas moleculares RT-qPCR ( $<8.100 \pm 0.017 \log_{10}$  cg/ml) y CRISPR-Cas13a ( $<9.671 \pm 2.811 \log_{10}$  cg/ml) presentaron mayores títulos virales en la detección de MNV-1 que la técnica celular TCID<sub>50</sub> ( $<7.668 \pm 0.047 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml).

En cuanto a los tratamientos térmicos del MNV-1, a 80 °C y -20 °C la detección mostró mayores reducciones, sobre todo en las diluciones más altas. Sin embargo, en relación con la linealidad entre TCID<sub>50</sub> y RT-qPCR mostró tener altos coeficientes de correlación sobre todo en los datos a 37 °C y -20 °C. Cuando se trataba MNV-1 con ARNasa, solamente el tratado a 80°C no mostró alta linealidad.

Contrario a esta, la técnica de TCID<sub>50</sub> y CRISPR-Cas13a no mostró altos coeficientes de correlación a excepción de los datos tratados a 5 °C cuando se expone ( $r = 0.810$ ) y no ( $r = 0.929$ ) a ARNasa. No se encontró buena linealidad ( $r = 0.606$ ) entre los datos de CRISPR-Cas13a y RT-qPCR en los tratamientos a 37 °C, 80 °C y -20 °C.

En cuanto a la equivalencia en radios entre TCID<sub>50</sub>: RT-qPCR y TCID<sub>50</sub>: CRISPR-Cas13a, con ambas técnicas moleculares tratadas con ARNasa, mostraron una sobreestimación de virus infectivos con excepciones a -20 °C y 5 °C. Igualmente, CRISPR-Cas13a y RT-qPCR con y sin tratamiento de ARNasa mostró altos valores radio debido a la diferencia en la detección de los títulos virales detectados, sobreestimando la presencia de virus intactos e infectivos.

## **10 PERSPECTIVAS**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los tratamientos térmicos y la aplicación del pretratamiento enzimático con ARNasa, se sugiere emplear tanto ARNasa-RT-qPCR en aquellos sectores de interés donde las temperaturas de congelación (-20 °C y 5 °C) sean un método de conservación idóneo.

A su vez, se recomienda la implementación de la Proteinasa K para eliminar falsos positivos en la técnica de TCID<sub>50</sub>, es decir, la subestimación de las partículas virales dañadas que cuentan aún con receptores intactos. Así como también, aumentar los tiempos de incubación de los tratamientos térmicos y/o mejorar la estandarización de la enzima ARNasa con el fin de eliminar posible presencia de fragmentos de ARN.

En cuanto a CRISPR-Cas13a, se espera que el desarrollo de esta técnica mejore con la implementación de duplex gARN tal como CRISPR-Cas de andamiaje que permita aumentar la especificidad de corte y elimine la posible actividad inespecífica.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

Alidjinou, E., Sane, F., Firquet, S., Lobert, P., y Hober, D. (2019). Resistance of enteric viruses on fomites. *Intervirology*, 61(5), 205-213.

Allen, D., y Harris, J. (2017). Methods for ascertaining norovirus disease burdens. *Human vaccines y immunotherapeutics*, 13(11), 2630–2636.

Allwood, P., Malik, Y., Hedberg, C., y Goyal, S. (2003). Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in water: a comparative study. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5707-5710.

Ao, Y., Lu, L., y Xu, J. (2023). Emergence of GII.4 Sydney[P16]-like Norovirus-associated gastroenteritis, China, 2020–2022. *Emerging infectious diseases*, 29(9), 1837-1841.

Arowolo, K., Ayolabi, C., Adeleye, I., Lapinski, B., Santos, J., y Raboni, S. (2023). Genetic diversity of norovirus in children with acute gastroenteritis in southwest Nigeria, 2015-2017. *Viruses*, 15(3), 644.

Bae, J., y Schwab, K. (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 477-484.

Baert, L., Wobus, C., Van Coillie, E., Thackray, L., Debevere, J., y Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 543–546.

Bai, G., Tsai, M., Lin, S., Hsu, Y., y Chen, S. (2023). Unraveling the interplay between norovirus infection, gut microbiota, and novel antiviral approaches: a comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 14(1212582), 1-12.

Baldridge, M., Turula, H., y Wobus, C. (2016). Norovirus regulation by host and microbe. *Trends in molecular medicine*, 22(12), 1047-1059.

Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A., Winkler, A., Zuber, S., y Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International journal of food microbiology*, 285(2018), 110–128.

Bozkurt, H., D'Souza, D., y Davidson, P. (2013). Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of food protection*, 76(1), 79–84.

Budicini, M., y Pfeiffer, J. (2022). Stabilization of Murine Norovirus by Bacteria. *Mosphere*, 7(3), 1-10.

Canales, R., Reynolds, K., Wilson, A., Fankem, S., Weir, M., Rose, J., Abd-Elmaksoud, S., y Gerba, C. (2019). Modeling the role of fomites in a norovirus outbreak. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 16(1), 16–26.

Cannon, J., Bonifacio, J., Bucardo, F., Buesa, J., Bruggink, L., Chan, M. C. W., Barclay, L., y Vinjé, J. (2021). Global trends in norovirus genotype distribution among children with acute gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*, 27(5), 1-8.

Casillas, N., Flores, F., Sotelo, I., Vera, M., García, A., Rivas, A., Lozano, A., García, S., Flores, A., y Heredia, N. (2020). Norovirus is the most frequent cause of diarrhea in hospitalized patients in Monterrey, Mexico. *Pathogens*, 9(672), 1-12.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2024). Norovirus Facts and Stats. <https://www.cdc.gov/norovirus/data-research/index.html> Acceso 13 de octubre, 2025.

Cervantes, A., Rendón, M., Martina, M., Iglesias, J., Bernárdez, I., y Martínez, A. (2019). Gastroenteritis aguda por norovirus en pacientes con atención hospitalaria: estudio transversal. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 76(4), 176-181.

Chen, J., Ma, E., Harrington, L., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. y Doudna, J. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436–439.

Chen, S., Tsai, C., Lee, Y., Lin, C., Huang, K., Chao, H., Lai, M. y Chiu, C. (2017). Intestinal microbiome in children with severe and complicated acute viral gastroenteritis. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G., Chan, M., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M., y Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The journal of general virology*, 100(10), 1393-1406.

Churgay, C., y Aftab, Z. (2012). Gastroenteritis in children: Part II. Prevention and management. *American family physician*, 85(11), 1066–1070.

Cook, N., Knight, A., y Richards, G. (2016). Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: A critical review. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1273–1294.

Dang, W., Xu, L., Ma, B., Chen, S., Yin, Y., Chang, K., Peppelenbosch, M. y Pan, Q. (2018). Nitazoxanide inhibits human norovirus replication and synergizes with ribavirin by activation of cellular antiviral response. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(11), 10-1128.

Departamento de Estado de Texas servicios de salud sucursal de operaciones de mariscos y vida acuática. (2022). Classification of shellfish harvesting areas of Galveston, BA.Texas Department of State Health Services Ed. Consultado en: <https://www.dshs.texas.gov/news-alerts/dshs-recalls-oysters-harvested-area-southeastern-galveston-bay>

DeWitt, C., Nelson, K., Kim, H., y Kingsley, D. (2024). Ultralow temperature high pressure processing enhances inactivation of norovirus surrogates. *International journal of food microbiology*, 408(110438), 1-23.

Di Felice, E., Mauroy, A., Dal Pozzo, F., Thiry, D., Ceci, C., Di Martino, B., Marsilio, F., y Thiry, E. (2016). Bovine noroviruses: a missing component of calf diarrhoea diagnosis. *The Veterinary Journal*, 207(1), 53-62.

DiCaprio, E. (2017). Recent advances in human norovirus detection and cultivation methods. *Current opinion in food science*, 14(1), 93–97.

Diez, M., Kovač, K., Raspor, P., Rodríguez, D., y Hernandez, M. (2011). Virus genome quantification does not predict norovirus infectivity after application of food inactivation processing technologies. *Journal of food environ virology*, 3(1), 141–146.

Duan, L., Yang, X., Zhan, W., Tang, Y., Wei, M., Chen, K., Liu, P., Xie, J., Zhang, C., Zhao, H., y Luo, M. (2022). Development of a rapid and accurate CRISPR/Cas13-based diagnostic test for GII.4 norovirus infection. *Frontiers in microbiology*, 13(912315), 1-8.

Duret, S., Pouillot, R., Fanaselle, W., Papafragkou, E., Liggins, G., Williams, L., y Van Doren, J. (2017). Quantitative risk assessment of norovirus transmission in food

establishments: evaluating the impact of intervention strategies and food employee behavior on the risk associated with norovirus in foods. *Risk Analysis*, 37(11), 2080-2106.

Elviss, N., Allen, D., Kelly, D., Akello, J., Hau, S., Fox, A., Hopkins, M., Derrick, J., O'Brien, S., Iturriza, M. y Conducted as part of NoVAS. (2022). Norovirus attribution study: Detection of norovirus from the commercial food preparation environment in outbreak and non-outbreak premises. *Journal of applied microbiology*, 133(6), 3391-3403.

Esposito, S., y Principi, N. (2020). Norovirus vaccine: priorities for future research and development. *Frontiers in immunology*, 11(1383), 1-9.

Fang, T., Zhang, L., Ding, W., Liu, Y., Li, P., Wang, W., Xiang, W., Wang, B., y Sun, W. (2023). Point-of-care testing for norovirus typing using Crispr/Cas12a combined with reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Bioconjugate chemistry*, 34(6), 1147–1156.

Fozouni, P., Son, S., Díaz, M., Knott, G, Gray, C., D'Ambrosio, M., Zhao, C., Switz, ., Kumar, G., Stephens, S., Boehm, D., Tsou, C., Shu, J., Bhuiya, A., Armstrong, M., Harris, A., Chen, P., Osterloh, J., Meyer-Franke, A., Joehnk, B., y Ott, M. (2021). Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 184(2), 323–333.

Gao, X., Yin, Y., Xie, J., Gong, S., y Li, X. (2025). CRISPR/Cas13a-mediated triple signal amplification strategy for viral RNA detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 422(1), 1-20.

Gootenberg, J. Abudayyeh, O., Lee, J., Essletzbichler, P., Dy, A., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N., Freije, C., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R., Livny, J., Regev, A., Koonin, E., Hung, D., Sabeti, P., Collins, J., y Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442.

Greer, A., Drews, S., y Fisman, D. (2009). Why "winter" vomiting disease? Seasonality, hydrology, and Norovirus epidemiology in Toronto, Canada. *EcoHealth*, 6(2), 192–199.

Gyawali, P., Kc, S., Beale, D., y Hewitt, J. (2019). Current and emerging technologies for the detection of norovirus from shellfish. *Foods*, 8(6), 187.

Hall, A., Wikswo, M., Manikonda, K., Roberts, V., Yoder, J., y Gould, L. (2013). Acute gastroenteritis surveillance through the national outbreak reporting system, United States. *Emerging infectious diseases*, 19(8), 1305-1309.

Hall, A., Wikswo, M., Pringle, K., Gould, L., y Parashar, U. (2014). Vital signs: foodborne norovirus outbreaks—United States, 2009–2012. *Morbidity and mortality weekly report*, 63(22), 491-495.

Hardstaff, J., Clough, H., Lutje, V., McIntyre, K., Harris, J., Garner, P., y O'Brien, S. (2018). Foodborne and food-handler norovirus outbreaks: a systematic review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(10), 589-597.

Hewitt, J., Rivera-Aban, M., y 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.

Hirneisen, K., y Kniel, K. (2013). Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and Tulane virus. *Journal of food protection*, 76(1), 139-143.

Hoelzer, K., Fanaselle, W., Pouillot, R., Van Doren, J., y Dennis, S. (2013). Virus inactivation on hard surfaces or in suspension by chemical disinfectants: systematic review and meta-analysis of norovirus surrogates. *Journal of food protection*, 76(6), 1006-1016.

Jun Zha, C., Zhang, H., He, S., Zhao, N., He, L., Yang, N., y Ming, Z. (2025). RT-RPA-assisted scaffold RNA transcription amplification activation Cas12a trans-cleavage strategy for one-pot miRNA detection. *Talanta*, 293(1), 1-29.

Kanwar, N., Hassan, F., Barclay, L., Langley, C., Vinjé, J., Bryant, P., George, K., Mosher, L., Matthews, J. y Selvarangan, R. (2018). Evaluation of RIDA® GENE norovirus GI/GII real time RT-PCR using stool specimens collected from children and adults with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 104(1), 1-4.

Kaufman, S., Green, K., y Korba, B. (2014). Treatment of norovirus infections: Moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Research*, 105(1), 80–91.

Khosla, N., Lesinski, J., Haywood-Alexander, M., deMello, A., y Richards, D. (2025). Machine learning and statistical classification in CRISPR-Cas12a diagnostic assays. *Biosensors and bioelectronics*, 279(117402), 1-9.

Kim, B., Chung, K. W., y Lee, J. H. (2018). Non-stop aptasensor capable of rapidly monitoring norovirus in a sample. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152(1), 315–321.

Kim, G., Park, G., Kang, S., Lee, S., Park, J., Ha, J., Park, K., Kang, M., Cho, M., y Shin, H. (2021). Applicability evaluation of male specific coliphage based detection methods for microbial contamination tracking. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1709-1715.

Kim, H., Jubinville, E., Goulet-Beaulieu, V., y Jean, J. (2025). Persistence of foodborne viruses on various frozen berries initially frozen at different temperatures and stored for up to two years. *International journal of food microbiology*, 443(111407), 1-9.

Kimura, Y., Shin, J., Nakai, Y., Takahashi, M., Ino, Y., Akiyama, T., Goto, K., Nagata, N., Yamaoka, Y., Miyakawa, K., Kimura, H., y Ryo, A. (2022). Development of parallel reaction monitoring mass spectrometry assay for the detection of human norovirus major capsid protein. *Viruses*, 14(7), 1416-1426.

Kirby, A., Gurgel, R., Dove, W., Vieira, S., Cunliffe, N., y Cuevas, L. (2010). An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *Journal of Clinical Virology*, 49(4), 254-257.

Kitajima, M., Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Katayama, H., Takeda, N., y Katayama, K. (2010). Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *Journal of virological methods*, 169(2), 269–273.

Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., y Jaykus, L. (2012). A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 295–309.

Koo, H., Ajami, N., Atmar, R., y DuPont, H. (2010). Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discovery medicine*, 10(50), 61-70.

Kotsiri, Z., Vidic, J., y Vantarakis, A. (2022). Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water—A systematic review. *Journal of environmental sciences*, 111(1), 367-379.

Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., y Koopmans, M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology*, 158(10), 2059–2068.

Leblanc, D., Gagné, M., Poitras, É., y Brassard, J. (2019). Persistence of murine norovirus, bovine rotavirus, and hepatitis A virus on stainless steel surfaces, in spring water, and on blueberries. *Food microbiology*, 84(103257), 1-9.

Lee, S., Si, J., Yun, H., y Ko, G. (2015). Effect of temperature and relative humidity on the survival of foodborne viruses during food storage. *Applied and environmental microbiology*, 81(6), 2075-2081.

Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., y Sirikanchana, K. (2021). Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications—a systematic review. *Water Research X*, 11(100080), 1-9.

Li, D., Baert, L., Xia, M., Zhong, W., van Coillie, E., Jiang, X., y 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.

Li, D., Tang, Q., Wang, J., Wang, Y., Zhao, Q., y Xue, C. (2009). Effects of high-pressure processing on murine norovirus-1 in oysters (*Crassostrea gigas*) in situ. *FOOD CONTROL*, 20(11), 992–996.

Li, X., Huang, R., y Chen, H. (2017). Evaluation of assays to quantify infectious human norovirus for heat and high-pressure inactivation studies using Tulane virus. *Food and Environmental Virology*, 9(3), 314–325.

Liu, P., Jaykus, L., Wong, E., y Moe, C. (2012). Persistence of Norwalk virus, male-specific coliphage, and *Escherichia coli* on stainless steel coupons and in phosphate-buffered saline. *Journal of food protection*, 75(12), 2151-2157.

Liu, X., Kang, X., Lei, C., Ren, W., y Liu, C. (2022). Programming the *trans*-cleavage activity of CRISPR-Cas13a by single-strand DNA blocker and its biosensing application. *Analytical chemistry*, 94(9), 3987–3996.

Lopman, B., Gastanaduy, P., Park, G., Hall, A., Parashar, U., y Vinjé, J. (2012). Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current opinion in virology*, 2(1), 96-102.

Lu, L., Zhong, H., Xu, M., Su, L., Cao, L., Jia, R., y Xu, J. (2019). Genetic diversity and epidemiology of Genogroup II noroviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2012-2017. *BMC infectious diseases*, 19(1), 736.

Lu, Y., Ma, M., Wang, H., Wang, D., Chen, C., Jing, Q., Geng, J., Li, T., Zhang, Z., y Yang, Z. (2020). An outbreak of norovirus-related acute gastroenteritis associated with delivery food in Guangzhou, southern China. *BMC public health*, 20(1), 25-32.

Lucero, Y., Matson, D., Ashkenazi, S., George, S., y O’Ryan, M. (2021). Norovirus: facts and reflections from past, present, and future. *Viruses*, 13(12), 2399-2417.

Manuel, C., Moore, M. y Jaykus, L. (2018). Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. *Food microbiology*, 76(1), 337-345.

Mariita, R., Davis, J., y Randive, R. (2022). Illuminating human Norovirus: a perspective on disinfection of water and surfaces using UVC, norovirus model organisms, and radiation safety considerations. *Pathogens*, 11(2), 226-239.

Marti, E., Ferrary-Américo, M. y Barardi, C. (2017). Detection of potential infectious enteric viruses in fresh produce by (RT)-qPCR preceded by nuclease treatment. *Journal of Food Environ Virology*, 9(1), 444–452.

McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., y Goodfellow, I. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS pathogens*, 7(12), 1-24.

McHugh, M., Guerendiain, D., Hardie, A., Kenicer, J., MacKenzie, L., y Templeton, K. (2018). Detection of Norovirus by BD MAX™, Xpert® Norovirus, and xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel in stool and vomit samples. *Journal of Clinical Virology*, 105(1), 72-76.

Mirmahdi, R., Dicker, S., Yusuf, N., y Montazeri, N. (2025). Navigating Uncertainties in RT-qPCR and Infectivity Assessment of Norovirus. *Food and environmental virology*, 17(1), 1-22.

Mohr, S., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B., Viswanatha, R., y Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *The FEBS journal*, 283(17), 3232–3238.

Monteiro, S., y Santos, R. (2017). 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.

Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., y Matsuzaki, Y. (2007). Prolonged norovirus shedding in infants. *The Pediatric infectious disease journal*, 26(1), 46–49.

Mustafa, M. I. y Makhawi, A. M. (2021). SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. *Revista de microbiología clínica*, 59(3), 1-10.

Nakaya, Y., Fukuda, T., Ashiba, H., Yasuura, M., y Fujimaki, M. (2020). Quick assessment of influenza A virus infectivity with a long-range reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction assay. *BMC infectious diseases*, 20(1), 585-594.

Navarro, N., Santiso, C., Vila, S., Carmona, N., Gozalbo, R., Cárcamo, R., Rodríguez, J., y Buesa J. (2022). Recombinant noroviruses circulating in Spain from 2016 to 2020 and proposal of two novel genotypes within genogroup I. *Microbiology spectrum*, 10(4), 1-13.

Netzler, N., Enosi, D., y White, P. (2019). Norovirus antivirals: Where are we now?. *Medicinal research reviews*, 39(3), 860-886.

Oristo, S., Lee, H., y Maunula, L. (2018). Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase. *Journal of applied microbiology*, 124(4), 1008–1016.

Ossio, A., Merino-Mascorro, A., Leon, J., Heredia, N., y Garcia, S. (2025). Detection of murine norovirus on fresh produce through a CRISPR/cas13a RNase-based capsid integrity assay. *Food and environmental virology*, 17(3), 1-29.

Painter, J., Hoekstra, R., Ayers, T., Tauxe, R., Braden, C., Angulo, F., y Griffin, P. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food

commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*, 19(3), 407-415.

Pang, X., Preiksaitis, J., y Lee, B. (2005). Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 33(2), 168-171.

Parada, J., Juárez, P., Natividad, I., Vázquez, C., y Quiñones, E. (2016). Identification of enteric viruses in foods from Mexico City. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 215-220.

Parra, G., Squires, R., Karangwa, C., Johnson, J., Lepore, C., Sosnovtsev, S., y Green, K. (2017). Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity. *PLoS pathogens*, 13(1), 1-22.

Parshionikar, S., Laseke, I., y Fout, G. (2010). Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4318–4326.

Pouillot, R., Van Doren, J., Woods, J., Plante, D., Smith, M., Goblick, G., Roberts, C., Locas, A., Hajen, W., Stobo, J., White, J., Holtzman, J., Buenavenutra, E., Burkhardt, W., Catford, A., Edwards, R y Calci, K. (2015). Meta-analysis of the reduction of norovirus and male-specific coliphage concentrations in wastewater treatment plants. *Applied and environmental microbiology*, 81(14), 4669-4681.

Predmore, A., y Li, J. (2011). Enhanced removal of a human norovirus surrogate from fresh vegetables and fruits by a combination of surfactants and sanitizers. *Applied and environmental microbiology*, 77(14), 4829-4838.

Qian, J., Boswell, S., Chidley, C., Lu, Z., Pettit, M., Gaudio, B, Fajnzylber, J., Ingram, R., Ward, R., Li, J., y Springer, M. (2020). An enhanced isothermal amplification assay for viral detection. *Nature communications*, 11(1), 5920.

Qiu, Y., Freedman, S., Williamson, S., Farion, K., Gouin, S., Poonai, N., Schuh, S., Finkelstein, Y., Xie, J., Lee, B., Chui, L., Pang, X., y On Behalf Of The Pediatric Emergency Research Canada Probiotic Regimen For Outpatient Gastroenteritis Utility Of Treatment Progut Trial Group (2023). Significantly Longer Shedding of Norovirus Compared to Rotavirus and Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis. *Virus*, 15(7), 1541-1551.

Randazzo, W. (2025). Pioneering use of human intestinal enteroids to prevent foodborne transmission of human norovirus. *Trends in Food Science y Technology*, 1568(104843), 1-20.

Rauch, J., Valois, E., Ponce-Rojas, J., et al. (2021). Comparison of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 screening using reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction or CRISPR-based assays in asymptomatic college students. *JAMA Netw Open*. 4(2), 1-21.

Raymond, P., Paul, S., y Guy, R. A. (2023). Impact of Capsid and Genomic Integrity Tests on Norovirus Extraction Recovery Rates. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(4), 826-841.

Razafimahefa, R., Ludwig-Begall, L., Le Guyader, F., Farnir, F., Mauroy, A., y Thiry, E. (2021). Optimisation of a PMAxx™-RT-qPCR assay and the preceding extraction method to selectively detect infectious murine norovirus particles in mussels. *Food and environmental virology*, 13(1), 93–106.

Reed, L., y Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27,(3), 493–497,

Richards, G. (2012). Critical review of norovirus surrogates in food safety research: rationale for considering volunteer studies. *Food and environmental virology*, 4(1), 6-13.

Robilotti, E., Deresinski, S., y Pinsky, B. (2015). Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 134-164.

Rodríguez, R., Pepper, I., y Gerba, C. (2009). Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 75(2), 297–307.

Rohayem, J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 524-527.

Ryu, S., You, H. J., Kim, Y. W., Lee, A., Ko, G. P., Lee, S. J., y Song, M. (2015). Inactivation of norovirus and surrogates by natural phytochemicals and bioactive substances. *Molecular nutrition & food research*, 59(1), 65–74.

Scheuer, K., Oka, T., Hoet, A., Gebreyes, W., Molla, B., Saif, L., y Wang, Q. (2013). Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging

porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2344–2353.

Shah, M., y Hall, A. (2018). Norovirus illnesses in children and adolescents. *Infectious disease clinics of North America*, 32(1), 103–118.

Shah, M., y Hall, A. (2018). Norovirus illnesses in children and adolescents. *Infectious Disease Clinics*, 32(1), 103-118.

Shamkhali, S., y Deng, Z. (2017). Environmental indicators for human norovirus outbreaks. *International journal of environmental health research*, 27(1), 40-51.

Shan, L., Yang, D., Wang, D., y Tian, P. (2016). Comparison of cell-based and PCR-based assays as methods for measuring infectivity of Tulane virus. *Journal of virological methods*, 231, 1–7.

Sherman, M., Smith, H., Cox, F., Wobus, C., Lynch, G., Pettitt, M., y Smith, T. (2025). Murine norovirus allosteric escape mutants mimic gut activation. *J Virol*, 99(25), 1-22.

Siqueira, R., y Rodríguez, D. (2022). Enteric viruses in food safety: New threats for an old problem. *Advances in food and nutrition research*, 100, 265–286.

Smith, H., y Smith, T. (2019). The dynamic capsid structures of the noroviruses. *Viruses*, 11(3), 235-258.

Smither, S., Lear-Rooney, C., Biggins, J., Pettitt, J., Lever, M., y Olinger, G. (2013). Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *Journal of virological methods*, 193(2), 565–571.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., y Uyttendaele, M. (2012). Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 1-9.

Taube, S., Perry, J., McGreevy, E., Yetming, K., Perkins, C., Henderson, K., y Wobus, C. (2012). Murine noroviruses bind glycolipid and glycoprotein attachment receptors in a strain-dependent manner. *Journal of virology*, 86(10), 5584-5593.

Teunis, P., Sukhrie, F., Vennema, H., Bogerman, J., Beersma, M., y Koopmans, M. (2015). Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiology and infection*, 143(8), 1710–1717.

Thornton, A., Jennings, K., y McCormick, M. (2004). Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Management & Response*, 2(1), 4-9.

Tian, P., Yang, D., Quigley, C., Chou, M., y Jiang, X. (2013). Inactivation of the Tulane virus, a novel surrogate for the human norovirus. *Journal of food protection*, 76(4), 712-718.

Tse, H., Lau, S., Chan, W., Choi, G., Woo, P., y Yuen, K. (2012). Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *Journal of virology*, 86(17), 9531–9532.

Urakami, H., Ikarashi, K., Okamoto, K., Abe, Y., Ikarashi, T., Kono, T., Konagaya, Y. y Tanaka, N. (2007). Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Applied and environmental microbiology*, 73(17), 5679-5682.

Vashist, S., Urena, L., y Goodfellow, I. (2012). Development of a strand specific real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of murine norovirus RNA. *Journal of virological methods*, 184(1-2), 69–76.

Villabruna, N., Koopmans, M., y de Graaf, M. (2019). Animals as reservoir for human norovirus. *Viruses*, 11(5), 478-491.

Villicaña, C., Amarillas, L., Cota, A., León, J., y Gómez, B. (2019). Environmental surveillance of norovirus and hepatitis A virus in raw oysters at seafood retails in Sinaloa, Mexico: detection of GII. P13 norovirus genotype. Preprint (version 1). Disponible en Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.2.10614/v1>].

Vinje, J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology*, 53(2), 373-381.

Wadl, M., Scherer, K., Nielsen, S., Diedrich, S., Ellerbroek, L., Frank, C., Gatzler, R., Hoehne, Johne, R., Klein, G., Kocj, J., Schulenburg, J., Thielbein, U., Stark, K., y Bernard, H. (2010). Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC infectious diseases*, 10(1) 1-10.

Wales, S. Q., Pandiscia, A., Kulka, M., Sanchez, G., y Randazzo, W. (2024). Challenges for estimating human norovirus infectivity by viability RT-qPCR as compared to replication in human intestinal enteroids. *International journal of food microbiology*, 411, 110507.

Wang, H., Jean, S., Wilson, S., Lucyshyn, J., McGrath, S., Wilson, R., Magrini, V., y Leber, A. (2022). A deletion in the N gene of SARS-CoV-2 may reduce test sensitivity for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 102(4), 1-10.

Weerathunge, P., Ramanathan, R., Torok, V., Hodgson, K., Xu, Y., Goodacre, R., Behera, B. K., y Bansal, V. (2019). Ultrasensitive Colorimetric Detection of Murine Norovirus Using NanoZyme Aptasensor. *Analytical chemistry*, 91(5), 3270–3276.

Wobus, C., Thackray, L., y Virgin, H. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of virology*, 80(11), 5104-5112.

Wolf, S., Williamson, W., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., y Greening, G. (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Veterinary microbiology*, 133(1-2), 184-189.

Woodward, J., Gkrania, E., y Kumararatne, D. (2017). Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(3), 363-370.

Yin, L., Man, S., Ye, S., Liu, G., y Ma, L. (2021). CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives. *Biosensors & bioelectronics*, 193(113541), 1-11.

Yu, J., Kim, N., Koh, Y., y Lee, H. (2010). Epidemiology of foodborne Norovirus outbreak in Incheon, Korea. *Journal of Korean medical science*, 25(8), 1128-1133.

Zaczek-Moczydlowska, M. A., Beizaei, A., Dillon, M., y Campbell, K. (2021). Current state-of-the-art diagnostics for Norovirus detection: Model approaches for point-of-care analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 684–695.