



Enfermedades Víricas Emergentes.

Emerging Viral Diseases.

JOSÉ MARÍA EIROS BOUZA

JMEIROS@UVA.ES

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-5357-6340](https://orcid.org/0000-0002-5357-6340)

SILVIA ROJO RELLO

SROJOR@SALUDCASTILLAYLEON.ES

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-3745-3201](https://orcid.org/0000-0002-3745-3201)

MARTA DOMINGUEZ-GIL

MDOMINGUEZGILGO@SALUDCASTILLAYLEON.ES

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-7957-5656](https://orcid.org/0000-0001-7957-5656)

MARTA HERNÁNDEZ PÉREZ

MARTA.HERNANDEZ.PEREZ@UVA.ES

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-6914-9987](https://orcid.org/0000-0001-6914-9987)

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA, MEDICINA LEGAL Y FORENSE. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. AVENIDA DE RAMÓN Y CAJAL, 7, 47005 VALLADOLID.

Eiros Bouza, José María; Rojo Rello, Silvia; Dominguez-Gil, Marta; Hernández Pérez, Marta (2024). *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, volumen:58: 207-229. DOI: <https://doi.org/10.24197/k1a63j02>

Artículo de acceso abierto distribuido bajo una [Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional \(CC-BY 4.0\)](#). / Open access article under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC-BY 4.0\)](#).

Resumen: Desde un punto de vista global, los virus son un grupo de agentes infecciosos que están constituidos esencialmente por una o varias cubiertas proteicas que albergan en su interior un ácido nucleico y algunas enzimas.

Genéricamente poseen tres características que les otorgan una particularidad propia en relación con otros seres vivos. En primer término, contienen un único tipo de ácido nucleico en su genoma, o bien un ácido desoxirribonucleico (ADN) o bien ácido ribonucleico (ARN). En segundo lugar, se reproducen a partir de su material genético por replicación. En tercera instancia, se comportan como parásitos intracelulares estrictos, dependiendo su supervivencia de la capacidad de la

partícula vírica (virión) para infectar una célula y dirigir la dotación enzimática de ésta para sintetizar una nueva progenie.

La denominación “virasisis emergentes” hace referencia tanto a las infecciones víricas de nueva aparición en la población, como a aquellas previamente conocidas cuya incidencia o distribución geográfica sufre un rápido aumento

En contra de lo que cabría esperar analizando el término mutación en cuanto a las consecuencias que puede generar si nos referimos a un ser humano, en el caso de los virus las mutaciones suponen generar nuevas capacidades. Los cambios genéticos en estos virus permiten nuevas adaptaciones, así como el escape continuo a la presión selectiva del sistema inmune del individuo y de los tratamientos

La información más compleja y específica de los virus residen en su secuencia genómica, es decir la composición en última instancia de los nucleótidos cuya concatenación alberga la información que les permite llevar a cabo su replicación y desarrollo. La secuencia completa del material genético de un virus se denomina genoma o borrador de genoma cuando éste es incompleto. Esta información sirve para comprender desde la evolución y difusión de un determinado virus hasta su comportamiento en el contexto de un brote epidémico o de una pandemia.

Palabras clave: Virus, Emergentes, Ecología, Secuenciación.

Abstract: From a global point of view, viruses are a group of infectious agents that are essentially made up of one or more protein coatings that contain a nucleic acid and some enzymes. Generically, they possess three characteristics that give them their own particularity in relation to other living beings. First, they contain a single type of nucleic acid in their genome, either deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA). Secondly, they reproduce from their genetic material by replication. Thirdly, they behave as strict intracellular parasites, their survival depending on the ability of the viral particle (virion) to infect a cell and direct its enzymatic endowment to synthesize new progeny.

The term “emerging virasisis” refers both to newly emerging viral infections in the population and to those previously known infections whose incidence or geographic distribution is rapidly increasing.

Contrary to what might be expected by analyzing the term mutation in terms of the consequences it can generate if we refer to a human being, in the case of viruses, mutations involve generating new capabilities. Genetic changes in these viruses allow new adaptations, as well as the continuous escape from the selective pressure of the individual's immune system and treatments. The most complex and specific information of viruses resides in their genomic sequence, i.e. the ultimate composition of nucleotides whose concatenation contains the information that allows them to carry out their replication and development. The complete sequence of the genetic material of a virus is called genome or draft genome when it is incomplete. This information is used to understand everything from the evolution and spread of a given virus to its behavior in the context of an epidemic outbreak or pandemic.

Keywords: Virus, Emerging, Ecology, High-throughput sequencing.

Sumario:

1. Ambito de la Virología Clínica
2. Virus Emergentes
3. Evolución y Ecología virales

4. La Secuenciación Masiva aplicada a la caracterización virológica

Summary:

1. Scope of Clinical Virology
 2. Emerging Viruses
 3. Viral Evolution and Ecology
 4. High-throughput sequencing applied to virological characterization.
-

1. AMBITO DE LA VIROLOGÍA CLÍNICA

Los virus que tienen interés en clínica se consideran integrantes de la clase general de los virus que infectan a los vertebrados. La hipótesis más plausible acerca de su origen es que derivan de material genético celular que ha adquirido una independencia funcional. La cuestión de la naturaleza se ha complicado con el conocimiento de otros elementos genéticos independientes que se comportan como agentes biológicos subcelulares. Entre estos cabe citar los “viroïdes”, formados por moléculas de ARN de escaso peso molecular, desprovistos de cubierta proteica y con capacidad patogénica para las plantas; no se ha descrito hasta la actualidad ningún caso de infección humana. Otros elementos son los denominados “satélites”, formados por moléculas de ARN o ADN dotados de una cubierta proteica no codificada en su genoma, que depende para su multiplicación de la coinfección de la célula hospedadora por un virus auxiliar. Estructuralmente no forman parte del genoma del virus asociado y su secuencia no tiene homología con la del ácido nucleico de aquel. Se han descrito algunos satélites con relevancia en patología humana como el virus de la hepatitis Delta y los Dependovirus. Cabe aludir, a pesar de la polémica que ello suscita, a los “priones”, con estructura muy simple en la que no intervienen ácidos nucleicos y que están constituidos por glucopéptidos, de bajo peso molecular que se evidencian como fibrillas en el seno de la sustancia amiloide de los tejidos del hospedador infectado. La información para la replicación de estas “proteínas infecciosas” está codificada en el ácido nucleico de la célula hospedadora sin expresarse normalmente y, desde el punto de vista patogénico se implican en procesos degenerativos del sistema nervioso central y otro tipo de entidades relacionadas.

Existen dos modelos básicos de interacción de los virus con las células. De una parte, la infección aguda, en la que se obtiene como resultado tanto la multiplicación viral como la lisis celular. De otra, la denominada infección persistente, potencialmente originada a su vez por una infección crónica, en que el virus adopta un estado de replicación mantenida que no condiciona la muerte de la célula infectada; o bien por una infección latente debida a la integración del ácido nucleico vírico en el genoma de las células hospedadoras y manteniendo la posibilidad de reactivarse posteriormente (Eiros Bouza et al, 1993). Se conoce también la existencia de determinados virus con capacidad oncogénica.

La estructura de un virión está integrada por dos elementos obligados: un ácido nucleico y una cubierta proteica que lo recubre, denominada cápside. Al conjunto de ambos se le denomina nucleocápside y los virus así constituidos se conocen como virus desnudos. Otros poseen además de los citados un tercer elemento estructural denominado membrana de envoltura o peplos, que suele adquirirse a partir de membrana de la célula que infectan. Los virus que poseen esta última estructura son los conocidos como envueltos. Todas las proteínas que componen la estructura del virus se denominan proteínas estructurales.

La información genética del virión está contenida en su ácido nucleico, que en cada virus es de un solo tipo, o bien ARN (ribovirus) o bien ADN (desoxirribovirus), constituyendo éste un criterio para efectuar su clasificación. Los virus ADN presentan un genoma que en unos casos es lineal como en los Parvovirus y en otros con disposición circular como en el caso de Herpetovirus (Herpes), Poxvirus (viruela) o Adenovirus, y puede ser plano o hiperenrollado y con una amplia variedad en el rango de sus pesos moleculares. Los virus ARN presentan un genoma habitualmente lineal, que en ocasiones se dispone en varios segmentos, lo cual favorece la recombinación genética entre diferentes cepas.

La cápside está constituida por la agrupación de subunidades proteicas denominadas capsómeros, los cuales pueden adoptar diferentes formas geométricas siguiendo un modelo de simetría que representa un segundo esquema para la clasificación de los virus. Básicamente existen cuatro tipos de simetría: icosaédrica, helicoidal, mixta y compleja. La

nucleocápside puede estar desnuda o envuelta por una membrana de naturaleza lipoproteica que, a su vez, puede estar provista de proyecciones glucoproteicas. La membrana de envoltura es un elemento estructural facultativo que convierte a los virus que la poseen en envueltos, utilizándose su presencia como un criterio de clasificación. Esta membrana de envoltura puede poseer también proyecciones de naturaleza proteica o glucoproteica codificadas por el propio genoma vírico, denominadas peplómeros o espículas, capaces de fijarse a receptores celulares. Desde el punto de vista funcional, lejos de constituir un elemento de protección de los virus favorece su destrucción por diversos agentes físico-químicos, tales como el éter, detergentes, sales biliares y los cambios de temperatura.

Los virus, debido a su simplicidad, sólo pueden multiplicarse en el interior de una célula, utilizando los sistemas metabólicos de ésta en su provecho. En este proceso se benefician de la dotación enzimática celular, pero también son capaces de inducir la síntesis de enzimas de uso exclusivo en la replicación vírica, que representan además dianas potenciales para los antivirales. En primer lugar, la adsorción del virión a la superficie celular es facilitada por la interacción entre proteínas de la superficie viral y receptores específicos de la membrana celular. Se conoce que determinados virus son capaces de unirse a más de un tipo de receptor de la célula hospedadora y a su vez utilizar vías alternativas de los receptores específicos para adsorberse a las células diana, ampliando así las estirpes celulares susceptibles de infección (Eiros Bouza et al, 1999). La penetración del virión en el interior de la célula difiere según los virus. Aquellos provistos de envoltura la funden con la membrana celular, mientras que los desnudos la atraviesan por un mecanismo similar a la endocitosis. El paso siguiente es la decapsidación y liberación del ácido nucleico del interior de la cápside, que puede realizarse al mismo tiempo que la penetración, o más tardíamente en una o varias etapas y, por lo general, depende de enzimas propios o de los celulares inducidos por la adsorción vírica. Una vez dentro de la célula el virus debe iniciar la síntesis del ácido nucleico y de las proteínas y para ello debe transcribir, replicar y traducir su información genética en múltiples nuevas copias de su ácido nucleico y proteínas estructurales. Las estrategias de replicación varían según el tipo de ácido nucleico viral (Eiros Bouza JM et al, 2005).

Los ribovirus se replican en el citoplasma, a excepción de los integrantes en la familia *Orthomyxoviridae* y, de modo esquemático,

pueden hacerlo de tres formas: En los virus con ARN monocatenario con polaridad positiva, éste puede actuar directamente como ARN mensajero (ARNm) y ser traducido a proteínas en los ribosomas de la célula diana. Cuando el ARN genómico tiene polaridad negativa requiere una estrategia diferente, ya que este ARN no puede actuar directamente como ARNm. Para ello contienen una ARN polimerasa dependiente de ARN, que transcribe un segmento de ARN de polaridad positiva a partir de los ARN genómicos originales de polaridad negativa. Estos ARNm de polaridad positiva ya pueden actuar como moldes para la replicación de nuevos ARN genómicos de polaridad negativa. Los virus con ARN segmentado (tanto si es monocatenario como si es bicatenario) poseen una ARN polimerasa que es ARN dependiente e interviene de manera decisiva en su replicación. En los Retrovirus su ARN genómico presenta polaridad positiva y es monocatenario y, sin embargo, este ARN no puede utilizarse directamente como ARNm. Por ello es transcrita a ADN a través de una ADN polimerasa dependiente de ARN, codificada por el virus (transcriptasa inversa). El ADN se integra en el genoma celular y a partir de este ADN proviral integrado se efectúa la expresión de los genes víricos y la replicación viral.

Los desoxirribovirus no han desarrollado estrategias de replicación tan complicadas como las de los ribovirus. En términos generales, tras la decapsidación el ADN viral se replica en el interior del núcleo de la célula, a excepción de los poxvirus y conceptualmente este proceso se desarrolla en tres fases, utilizando fundamentalmente para la transcripción enzimas de origen celular. En la fase precoz, una pequeña parte del genoma vírico se transcribe a ARNm precoces por la acción de una ARN-polimerasa celular dependiente del ADN. Estos ARNm migran al citoplasma donde son traducidos a proteínas precoces que poseen esencialmente funciones reguladoras y que codifican para enzimas tales como la ADN-polimerasa. En una fase intermedia ocurre la replicación del ADN mediante la acción de las ADN-polimerasas ya citadas, y con ello, se efectúa la producción de un gran número de copias de ADN viral de acuerdo con un modelo semiconservativo similar al de las células eucariotas. En la fase tardía, los ADN neoformados sirven de matriz para una segunda transcripción que conduce a la síntesis de ARNm tardíos, que serán traducidos a proteínas estructurales que, a su vez, configurarán el nuevo virión.

En algunos virus la dotación de su ácido nucleico no permite una replicación completa (virus defectivos) y es necesario que se multipliquen en presencia del ciclo replicativo de otro virus (complementarios) que permite completar el ciclo replicativo de aquellos. Para la replicación del ácido nucleico se necesitan proteínas precoces, generalmente enzimas del tipo ARN y ADN-polimerasas, posteriormente tiene lugar la síntesis de las proteínas tardías estructurales del propio virus, de las reguladoras que modulan el grado de expresión viral y de las proteínas no estructurales, que aparecen en la célula en el curso de la replicación vírica, pero que no integran el virión maduro.

Existe tras la síntesis de ácido nucleico y proteínas una etapa en la que se produce su ensamblaje, conducente a la formación de nucleocápside en el núcleo (virus ADN) o en el citoplasma (virus ARN). Finalmente tiene lugar la liberación, que en los virus desnudos se produce por lisis celular y en los envueltos por gemación a través de la membrana celular, bien sea nuclear o citoplasmática, a la que se incorporan determinadas proteínas virales originando la membrana de envoltura.

Las vías de transmisión fundamentales de los virus son la aérea, la digestiva, la piel, las mucosas (orofaringe, conjuntiva, tracto genital), la sangre, la recepción de órganos para trasplante, la transplacentaria y a través de vectores.

El determinante fundamental de la capacidad de un virus para infectar una célula es la existencia de receptores en la superficie de ésta para las estructuras más externas del virión (membrana de envoltura o cápside). Una vez que los virus se han adherido a sus receptores específicos a través de las puertas de entrada se inicia una etapa de la infección que consiste en la replicación vírica local. Desde el punto de vista clínico, esta fase puede ser asintomática u originar manifestaciones focales aisladas que en ocasiones se acompañan de sintomatología general. A partir de la puerta de entrada, el virus puede adoptar cuatro estrategias básicas: permanecer localizado, propagarse por contigüidad (de célula a célula), extenderse por vía linfática y hemática produciendo una primera fase de viremia, o extenderse por vía nerviosa.

Los virus que llegan a las células del sistema mononuclear fagocítico de los ganglios, bazo o hígado pueden replicarse de nuevo,

originando una segunda diseminación hemática conocida como segunda fase de viremia. A partir de ésta alcanzan sus órganos diana. La duración de cada uno de estos periodos condiciona la aparición y cronología de la sintomatología y semiología clínicas.

Los virus se clasifican de una manera simple, atendiendo al tipo de ácido nucleico que poseen, en ribovirus y desoxirribovirus. Además de los criterios mencionados en los apartados precedentes existen otros que tienen interés taxonómico. Entre ellos los más importantes y relacionados con el ácido nucleico son: el carácter mono o bicanalario, su polaridad (positiva o negativa), el carácter segmentado o no, y en los ácidos nucleicos bicanalarios la disposición conformacional de sus hebras. Se utilizan también como criterios para la clasificación la simetría de la cápside (icosáédrica, helicoidal o compleja), el número de capsómeros, el lugar de replicación intracelular (nuclear o citoplasmático), la presencia o ausencia de membrana de envoltura, el diámetro del virión y la sensibilidad o resistencia al éter, cloroformo y otros solventes orgánicos.

Los continuos descubrimientos de nuevos virus y la adopción de normas de nomenclatura correctas son objeto de mantenido estudio por parte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (<https://talk.ictvonline.org>), quien cada varios años emite un Informe al respecto. En éste se establece una categorización jerárquica descendente en Ordenes, Familias, Subfamilias, Géneros y Especies, con niveles intermedios entre unos y otros. La designación que se adopta para denominar el orden de los virus es virales, las familias es *viridae*, para las subfamilias *virinae* y para los géneros “virus”. Aunque la clasificación de la mayoría de los virus recogidos en familias y géneros está suficientemente establecida, existen otros que sufrirán modificaciones taxonómicas en los próximos años, así como virus pendientes de clasificación definitiva.

Las familias de ribovirus más importantes con interés en patología humana son: *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Arenaviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*. (Eiros et al , 1996; Eiros et al, 1997) Entre los desoxirribovirus con interés en patología humana cabe enumerar las siguientes familias: *Parvoviridae*,

Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae y Poxviridae.(Inglada et al, 1996)

2. VIRUS EMERGENTES

La denominación “virirosis emergentes” hace referencia tanto a las infecciones víricas de nueva aparición en la población, como a aquellas previamente conocidas cuya incidencia o distribución geográfica sufre un rápido aumento. Los mecanismos que facilitan la aparición de las infecciones víricas emergentes son al menos tres. En primer término mediante la aparición de un virus desconocido por la evolución de una nueva variante. En segundo lugar a través del traspaso de la barrera de especie, lo que condiciona la introducción en un huésped de un virus existente en otra especie. Y en tercera instancia por la diseminación de un determinado virus a partir de una pequeña muestra poblacional (humana o animal), que actúa como nicho ecológico, en la que aquel surgió o fue originariamente introducido (Eiros Bouza JM et al, 2021).

Aunque este fenómeno no es nuevo, existe una creciente preocupación internacional por su notable incremento, detectado fundamentalmente en las cuatro últimas décadas. Durante éstas se han descrito un número importante de nuevos virus cuya consideración como causantes de enfermedades emergentes reviste mantenida actualidad. Además, un número elevado de virus ya conocidos han resurgido, siendo especialmente destacables algunos arbovirus como Dengue, “West Nile”, Fiebre Amarilla, Encefalitis Japonesa, Fiebre del Valle del Rift y Chikungunya, entre otros. Cabe distinguir, sin embargo, las infecciones emergentes o reemergentes de aquellas derivadas de descubrimientos producidos gracias a los recientes avances tecnológicos que han conseguido identificar patógenos que circulan desde hace mucho y cuyos efectos son ampliamente conocidos.

La enorme diversidad de patógenos emergentes y reemergentes se correlaciona con una gran variabilidad de ciclos biológicos, rutas de transmisión, patogenicidad y epidemiología. Se ha determinado que la capacidad deemerger se relaciona con algunos taxones (grupos de clasificación) de patógenos más que con otros, con ciertas rutas de

transmisión y con un amplio espectro de huéspedes. La mayoría de los virus emergentes son zoonóticos, siendo los que infectan animales domésticos y silvestres los que requieren mayor atención (Eiros, 2022). Entre los animales implicados se incluyen fundamentalmente los vertebrados tales como roedores, primates y murciélagos, así como las aves. El peligro de estos virus viene dado por su capacidad de salto interespecífico pudiendo así afectar a una nueva población que no ha desarrollado ningún tipo de inmunidad ni respuesta protectora frente al nuevo agente.

Está bien probado que las zoonosis se transmiten generalmente a través de vectores. Teniendo en cuenta su modo de transmisión el mayor número de zoonosis corresponde a las viriasis transmitidas por artrópodos (fundamentalmente los de vectores generalistas), seguidos de los que requieren contacto indirecto (a través de alimentos o agua) y finalmente los de contacto directo. Ciertas condiciones de la vida actual favorecen estos saltos y hay que hacer una mención especial a los xenotrasplantes y otras infecciones adquiridas a través de bioproductos (tal como la contaminación con SV40 de ciertos lotes de las vacunas para la polio que tuvo lugar en la década de los 50 del siglo pasado) que podrían introducir en un individuo inmunodeprimido patógenos que hayan escapado a los métodos convencionales asociados a la detección de agentes infecciosos.

Existen varias características comunes a la mayoría de los virus emergentes y reemergentes, lo que permite establecer un perfil de “virus emergente modelo”. Este obedecería a un virus con genoma ARN, zoonótico, transmitido por vectores, que sobrevive en reservorios (aquellas especies animales susceptibles de ser infectadas pero no padecen la enfermedad), capaz de utilizar receptores conservados en muchas especies, potencialmente trasmisible entre humanos y cuyo ecosistema se encuentra en áreas que están sufriendo cambios ecológicos, demográficos o sociales (Sánchez Seco Fariñas et al, 2006).

El fenómeno de la aparición de nuevos virus o al resurgimiento de los ya conocidos no resulta explicable con modelos simples. La mayoría de los autores coincide en señalar que se trata más bien de una interacción de factores que abarcan tres aspectos fundamentales: la población susceptible, el propio virus y el entorno de ambos. Algunos de los factores

que contribuyen a facilitar la emergencia de infecciones víricas son Demográficas, Climáticos, Desigualdades sociales, Comercio y Viajes internacionales, Infraestructura y Medidas de Salud Pública y Evolución viral. Resulta evidente que la inmigración desde áreas rurales a las ciudades implica grandes cambios demográficos. La OMS considera que en el año 2025 el 65% de la población mundial vivirá en ciudades. Los viajes y la inmigración tras conflictos armados también suponen grandes movimientos de poblaciones. Así a finales de la década pasada unos 140 millones de inmigrantes trabajaban legal o ilegalmente en otro país. El número total de desplazados y refugiados alcanzó en 2019 el récord de 79,5 millones, cerca del 1% de la población mundial, según destacó un informe del Alto Comisionado de las Naciones Unidas para los Refugiados (ACNUR).

Una situación que ilustra cómo el comportamiento afecta a la aparición y diseminación de nuevas infecciones y de qué modo estos nuevos agentes infecciosos influyen en la conducta humana es el caso de los Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o el SARS-CoV-2.

Está descrito que en la industria alimentaria como en otras se tiende hacia la obtención de mayores volúmenes de producto por unidad de tiempo. Esto favorece una rápida expansión de los agentes infecciosos presentes en productos contaminados que escapan a los controles pertinentes. Si bien son pocos los casos en los que la Industria Alimentaria se ha visto implicada en la ocurrencia de agentes víricos emergentes, no así en su transmisión, por lo que está sometida a estrictos controles sanitarios. Algunas prácticas sanitarias también se han visto involucradas en eventos importantes de transmisión. Tanto los VIH como los Virus de las Hepatitis B y C se transmitieron a través de productos utilizados en donaciones de sangre cuando todavía no se hacía un control rutinario de estos patógenos. En el ámbito sanitario se ha sufrido también en los últimos tiempos importantes infecciones nosocomiales entre las que cabe destacar infecciones por Ebola (Eiros Bouza JM et al 2015), Lassa, o los Coronavirus productores del SARS y SARS-CoV-2 (Hernández M et al, 2020), entre otros.

Resultan asimismo importantes los cambios asociados al desarrollo de la agricultura ya que se han dedicado al cultivo agrícola terrenos tradicionalmente silvestres. Estos cambios han producido brotes de ciertos

agentes, en su mayoría zoonóticos, con altas tasas de letalidad. Algunos de ellos son: Virus Hantaan transmitido por el roedor *Apodemus agrarius* que habita en campos de arroz e infecta a la población durante la recogida del cereal (Rivero et al, 2002); el Virus Junín (Fiebre Hemorrágica Argentina) que se vió afectado por la conversión de campos de hierba a maizales lo cual favoreció la expansión del roedor reservorio, el ratón maicero (*Calomys musculinus*), aumentando así los casos de infección en humanos o la emergencia de virus de la Gripe aviares que parece tener origen en granjas chinas de patos, que pueden actuar como reservorios, y cerdos, que favorecen la mezcla y generación de nuevas cepas gripales con capacidad de infectar al ser humano. Otro factor importante es el agua puesto que mosquitos y otros artrópodos se alimentan en aguas estancadas siendo por lo tanto la construcción de pantanos, cambios de curso de ríos o almacenamiento de la misma en recipientes factores que favorecen la expansión de vectores y virus como Dengue (transmitido por mosquitos, principalmente *Aedes aegypti*), Encefalitis Japonesa (cuyos vectores son mosquitos de los géneros *Aedes* y *Culex* (principalmente *C. tritaeniorhynchus*, *C. annulus*, *C. fuscoccephala* y *C. gelidus*) o Fiebre del Valle del Rift (por picadura de mosquitos infectados, sobre todo de los géneros *Aedes* y *Culex*, y también es posible la transmisión por moscas hematófagas)

Los cambios del hábitat pueden afectar de manera muy notoria al grado de dispersión de los virus cuyo huésped es un animal y en especial de los transmitidos por vectores. Además de las temperaturas y el calentamiento global asociado, que favorece la expansión y asentamiento de vectores desde áreas tropicales a zonas templadas, la disponibilidad de agua, tal como se ha mencionado previamente, es un factor clave. Parece que en la aparición de Hantavirus causantes del Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) en EEUU, que coincidió con un incremento de Hantavirus en Europa, el clima jugó un papel importante pues se produjeron un invierno y una primavera extremadamente suaves y húmedos que favorecieron el aumento de la población de roedores y por tanto su contacto con la población humana.

Algunos de los factores que afectan a la población son el incremento en la media de edad, mayores niveles de inmunosupresión, mayor exposición a radiaciones UVA, stress, etc, pero sobre todo hay que

tener en cuenta las desigualdades sociales. La pobreza favorece la aparición y asentamiento de nuevos agentes infecciosos. Así por ejemplo en la epidemia ocurrida en Zaire en 1976 provocada por el virus Ébola las personas afectadas fueron aquellas que no contaban con los medios necesarios para mantener adecuadas condiciones sanitarias mientras que las personas con mayor estatus económico no se infectaron. Además, muchas de las enfermedades reemergentes reaparecen tras mantenerse en una bolsa de población, caracterizada en muchas ocasiones por niveles altos de pobreza, desde donde el agente infeccioso se expande.

A lo largo de la historia los viajes han llevado en muchas ocasiones la expansión de enfermedades. La rata y con ella las enfermedades infecciosas asociadas fueron transportadas a Europa en barco desde Asia a través, probablemente, de la ruta de la seda. La viruela fue llevada desde Europa al nuevo mundo por los conquistadores españoles. El comercio de esclavos desde África trajo al mosquito *Aedes aegypti* y la fiebre amarilla a Europa y América. En la actualidad debido a los grandes avances en comunicaciones y al mayor acceso de la población general a grandes viajes este factor cobra una mayor importancia ya que infecciones que aparecen en cualquier parte del mundo pueden atravesar continentes enteros en días o semanas (Eiros Bouza et al, 2004). Así, el mosquito *Aedes albopictus*, vector potencial para un elevado número de arbovirus y de gran agresividad, ha sido diseminado por todo el mundo al haber sido transportado en cargamentos de neumáticos provenientes en principio de Asia y después de cualquier lugar con presencia del vector. Sin embargo, la pandemia creada por el Coronavirus SARS-CoV-2 causante de la Covid-19 es tal vez el ejemplo que mejor ilustra este aspecto (García Cruces et al, 2020).

Los virus pueden viajar en su vector o también ser portados por un enfermo extendiéndose las consecuencias más allá del viajero a la población y al ecosistema. Existen numerosos motivos para viajar: ocio, negocios, inmigración (Eiros Bouza et al, 2007), refugiados, peregrinos, misioneros, cooperantes, marinos mercantes, estudiantes, trabajadores temporales, ejércitos, fuerzas de paz, etc. Más de 1.400 millones de personas viajaron por el mundo en 2019 según la Organización Mundial del Turismo.

Además de unas medidas sanitarias y de higiene adecuadas, los sistemas de salud pública deben ser capaces de dar una respuesta adecuada tanto a nivel de prevención como de diagnóstico y tratamiento. Los

pasados brotes causados por el Coronavirus causante del SARS como la pandemia del SARS-CoV-2 son un buen ejemplo. En ambos casos, aun con matices parece que las autoridades sanitarias locales adolecieron de rapidez al dar una respuesta. Esto implicó que las medidas se tomaran cuando ya la infección estaba demasiado extendida en el primer caso y en el segundo era pandémica.

Los agentes infecciosos son organismos vivos y dinámicos con capacidad de adaptación al medio. Esto es especialmente importante en los virus cuyo genoma es ARN ya que sus polimerasas presentan una tasa de error muy elevada facilitando el cambio rápido en estos agentes. Una situación típica la constituyen las reinfecciones anuales por diferentes cepas de virus gripales producidas por pequeños cambios genómicos (“shift” antigénico) que hacen que los sitios antigenicos se modifiquen y escapen a la respuesta inmune generada en la población frente a otras cepas.

En el análisis de los factores que favorecen la emergencia y la reemergencia de las infecciones víricas, se deben considerar los factores que influyen tanto en la introducción de un nuevo patógeno en la población como los que intervienen en su establecimiento y posterior diseminación (Eiros Bouza, 2024)

Una vez que el nuevo patógeno se establece en la población humana, su diseminación geográfica y la magnitud de los brotes dependen esencialmente de la vía de transmisión y de la rapidez de su distribución a nuevos grupos poblacionales así como del periodo de viremia, de la letalidad asociada y del número inicial de infectados. Sin embargo, la capacidad de los servicios de salud para controlar la infección en la población es el factor principal que determina el impacto de la misma.

3. EVOLUCION Y ECOLOGIA VIRALES

Los virus ARN, como en el caso del Ébola o de la Gripe entre otros, poseen mecanismos muy poco fiables de replicación de su material genético debido

a la existencia de ARN polimerasas con muy poca capacidad para la corrección de errores. Esto provoca que el virus sufra cambios genéticos de forma bastante frecuente durante el proceso de infección de un paciente, generando cambios continuos en las proteínas que poseen capacidad antigénica (generación de respuesta en el individuo infectado) escapando de forma continua de la acción del sistema inmune (8×10^{-4} nucleótidos por año en el caso del virus Ébola, y 2.0×10^{-6} nucleótidos por cada ciclo infeccioso en el caso de la gripe). En este sentido, esta es la causa por la que las vacunas frente al virus de la gripe necesitan adecuarse cada año a las nuevas cepas circulantes. En el caso del Ébola, esta tasa de mutación es algo menor, aunque provoca igualmente una variación continua del virus, y la necesidad de su vigilancia. En el caso del SARS-CoV-2 su genoma se copia por la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que puede introducir errores, pero posee un mecanismo intrínseco de corrección motivado por la enzima reparadora ExoN con actividad 3'-5' exonucleasa que corrige errores de copia y hace que su tasa de mutación sea inferior a otros virus (Eiros JM et al, 2022). La OMS estimó inicialmente una tasa de mutación de $1,12 \times 10^{-3}$ por año y los epidemiólogos han descrito que este virus está cambiando aproximadamente dos nucleótidos por mes.

En contra de lo que cabría esperar analizando el término mutación en cuanto a las consecuencias que puede generar si nos referimos a un ser humano, en el caso de los virus las mutaciones suponen generar nuevas capacidades. Los cambios genéticos en estos virus permiten nuevas adaptaciones, así como el escape continuo a la presión selectiva del sistema inmune del individuo y de los tratamientos. Los cambios genéticos además

pueden aportar de forma muy eventual y de forma poco frecuente, cualidades que le otorguen al virus mayor virulencia, mejor capacidad de transmisión, o el incremento de la eficiencia para infectar otras especies. Por otro lado, la mayor parte de las mutaciones que suceden en estos virus son no ventajosas o silentes, eliminando al virus en el primer caso y no produciendo ningún tipo de novedad en el segundo.

Una alta letalidad provoca que el virus no pueda transmitirse de forma demasiado eficiente entre la población, por lo que, al aumentar este valor, se disminuyen las posibilidades de que el virus pueda generar un evento epidémico de forma global. Debido a la naturaleza de los virus, estos necesitan por obligación la infección de células del huésped para poder llevar a cabo su multiplicación y su progresión en la infección. La muerte del paciente conlleva el corte de la cadena de transmisión del virus, evitando que este se pueda propagar rápidamente. Pese a que el virus Ébola sea muy transmisible en pacientes fallecidos por esta enfermedad, la capacidad de contagio en la población siempre será mayor en pacientes vivos debido al movimiento de estos en la comunidad.

Debido a que la tasa de mutación de estos virus es más o menos constante y que no se ve alterada por mecanismos externos que puedan acelerarla o ralentizarla (a excepción de la aparición de mutaciones que puedan cambiar la afinidad de las ARN polimerasas), la selección de mutaciones depende de la estabilidad o inestabilidad del entorno que rodea al virus. En el caso de un entorno estable, que no presente cambios constantes ni presiones selectivas elevadas (como en el caso de un virus de aparición reciente, donde la mayor parte de la población no posee inmunidad frente al mismo en tanto no se diseñen y apliquen medidas de inmunización), el virus tenderá a mantenerse un genoma estable debido a que no se seleccionarán variantes que no sean ventajosas. Por el contrario, si el ambiente es cambiante y las condiciones que rodean al virus son diferentes, se tenderán a seleccionar nuevas variantes que estén mejor adaptadas a las nuevas características del entorno. De forma natural, en los primeros años desde la aparición de un nuevo virus emergente, como en el caso de la gripe A/H1N1pdm09 aparecida en el año 2009, se ha demostrado como dichos virus tienden a mantenerse estables sin variaciones destacables en su genoma. Es sin embargo como consecuencia del comienzo de la generación de inmunidad en la población debido a la

circulación de estos virus, cuando por la presión selectiva de esta inmunidad el virus comienza a variar por la selección natural de las variantes genéticas más eficaces. Es por tanto imposible controlar el flujo genético de este tipo de virus con el conocimiento y la tecnología actual, ya que no existen herramientas que permitan controlar de forma exacta los factores que provocan la selección de variantes nuevas en los virus descritos.

4. LA SECUENCIACIÓN MASIVA APLICADA A LA CARACTERIZACIÓN VIROLÓGICA

La información más compleja y específica de los virus es su secuencia genómica, es decir la composición en última instancia de los nucleótidos cuya concatenación alberga la información que les permite llevar a cabo su replicación y desarrollo. La secuencia completa del material genético de un virus se denomina genoma o borrador de genoma cuando este es incompleto. Esta información sirve para comprender desde la evolución y difusión de un determinado virus hasta su comportamiento en el contexto de un brote epidémico o de una pandemia.

Los inicios de la secuenciación se sitúan en 1975, año en el que Sanger y Coulson publicaron el primer método enzimático para secuenciar ADN a través de la incorporación de dideoxinucleótidos terminales, y en 1977 publicaron la secuencia del bacteriófago PhiX174, un año después que investigadores belgas que publicaran el genoma del bacteriófago MS2 en 1976. Una década más tarde aparecieron los secuenciadores automáticos, que primero empleaban geles y después capilares recubiertos de polímero. A comienzos del siglo XXI surgieron nuevos métodos de secuenciación masiva, basados en la pirosecuenciación y las denominadas plataformas de “Next Generation Sequencing” (NGS). El desarrollo de esta técnica de secuenciación masiva se ha extendido tras aparecer la secuenciación por síntesis.

En la actualidad es más apropiado emplear el término de “High-Throughput Sequencing (HTS)” o “secuenciación masiva”, porque han surgido nuevas generaciones de secuenciadores que aplican otras tecnologías de secuenciación en paralelo. Entre éstas se encuentra la secuenciación por ligación (“Sequencing by Oligonucleotide Ligation and

Detection”) del equipo SOLiD —introducido en el mercado en 2007 por Life Technologies y ya descatalogado—, la secuenciación por síntesis y semiconducción del Ion Torrent, la secuenciación por síntesis en “clusters” de la compañía Solexa —luego, Illumina—, que apareció en su primer equipo GAII en 2006, y otros secuenciadores que fueron comercializados posteriormente, como el MiSeq, a partir de 2011 Una generación posterior de secuenciadores son los que emplean la secuenciación de molécula única (“Single Molecule Real-Time”, SMRT), como los equipos de secuenciación en nanoporos tanto portátiles como el MinION, como de mesa como el GridION y PromethION de Oxford Nanopore Technologies (2014), y el equipo PacBio de Pacific Biosciences (2010), que permiten secuenciar moléculas más largas, de hasta 30 Kb.

La aplicación de la secuenciación masiva al estudio de los virus, además de reducir los costes y el tiempo de análisis, genera una gran cantidad de información, que está cambiando el modo de cómo se realiza la investigación en virología. Por el momento, la secuenciación no es una técnica estandarizada para un laboratorio de diagnóstico clínico. Requiere un laboratorio de purificación de ADN/ARN de cierta calidad, con un flujo de trabajo en una sola dirección para evitar contaminaciones cruzadas, y extremada exactitud de pipeteo, porque se secuencia en el rango de picomoles. Si bien existen robots que automatizan el proceso a gran escala. Además, para rentabilizar la información que comporta disponer de un genoma, es deseable tener conocimientos bioinformáticos. La bioinformática aplica las matemáticas, la estadística y la computación al estudio biológico y requiere conocimientos básicos en lenguajes de programación (Bash, Perl, Python y R, entre otros) y, preferentemente, también del uso de sistemas operativos basados en UNIX, como Linux y MacOs. Algunas compañías proveen de sistemas cerrados de secuenciación que proveen de la información final (especie, variantes, genes de interés como los de resistencia a antivirales, etc...). Pero la disponibilidad del genoma anotado permite analizar otra información que puede ser de gran interés. Además, los programas de ensamblado, anotación, búsqueda de mutaciones (SNPs, indels), etc. se actualizan con gran rapidez y están disponibles de forma gratuita en repositorios colaborativos como GitHub.

La secuenciación masiva consta de cuatro etapas principales: la extracción del ADN o ARN de la muestra o aislado en cultivo, la preparación de las bibliotecas o librerías, la secuenciación propiamente dicha y el análisis bioinformático e interpretación de los resultados. Antes de introducir una muestra en el secuenciador, es necesario la preparación de bibliotecas (que denominaremos librerías) de un tamaño determinado, es decir, es preciso preparar los fragmentos que van a ser secuenciados. Ello implica dos acciones, la primera fragmentar el ADN, bien transcrita a partir de ARN o el ADN vírico directamente, por métodos bioquímicos (enzimáticos) o físicos (nebulización o ultrasonido), la segunda amplificar el ADN en fragmentos por PCR, tal y como se realiza en el protocolo ARTIC para la secuenciación del SARS-CoV-2. Posteriormente se realiza el marcado de dichos fragmentos con índices (“barcoding”), para poder secuenciar a la vez múltiples muestras equimolecularmente (“multiplexear”). También conlleva el reparado de los extremos y la incorporación en los fragmentos de oligonucleótidos de dos tipos, el índice que hemos comentado para la secuenciación de múltiples muestras, y también se incorpora un olinucleótido adaptador complementario a aquellos que hay prefijados en el soporte (“flow cell”) para ser secuenciados en clusters, en el caso de la tecnología Illumina. La forma de secuenciar puede ser en un sentido de la doble hebra de ADN “single-end sequencing” o en ambos, es decir, 5’ y 3’, en lo que se denomina “paired-end sequencing”.

El análisis de datos conlleva una serie de etapas (Hernández et al, 2019): el análisis primario (la generación de datos y el control de calidad), el secundario (alineamiento de fragmentos y ensamblado de referencia o de novo) y el terciario (generación de datos a partir de los resultados de la etapa de análisis secundario: anotación, búsqueda de mutaciones, variantes, genes de resistencia a antivirales, etc.). Una vez concluida la secuenciación, en los secuenciadores de nanoporos (Oxford nanopore) se obtiene un fichero FAST5 que necesita ser convertido a FASTQ. En los secuenciadores por síntesis (Illumina) se realiza en el propio secuenciador la conversión de los archivos BLC (“Binary Base Call”) a archivos FASTQ. Este tipo de archivo se obtiene para cada uno de los paired-ends, es decir, uno para el “forward” o secuencia sentido y otro para el “reverse” o secuencia antisentido correspondientes a cada muestra; dicho archivo contiene información del secuenciador, la secuencia propiamente dicha o “reads” y los datos de calidad (“phred score”) basados en código ASCII

(en el que cada letra representa un valor numérico), de manera que una secuencia con phred score = 10 tiene un 90% de eficacia (1 base mal secuenciada por cada 10) y una secuencia con phred score = 30 tiene un 99,9% de eficacia (1 base mal secuenciada cada 1.000), este valor se denomina Q30. A partir de este archivo FASTQ se realiza el filtrado por calidad en virtud de distintos parámetros y la eliminación de restos de oligonucleótidos como los índices. Una vez que se obtiene la secuencia filtrada por calidad, se puede realizar el ensamblado del genoma para identificar la especie y el linaje contra bases de datos específicas o mediante el uso de herramientas bioinformáticas, como por ejemplo PANGOLIN 2.0 que denomina y asigna linajes en SARS-CoV-2. El genoma puede ser anotado para identificar genes de interés.

La secuenciación de un genoma permite identificar y tipar un virus y estudiar su diversidad filogenética (filogenia en sentido laxo, ya que los virus no heredan su material genético de su predecesor, si no que se replican, por lo que en términos estrictos su clasificación es en dendrogramas o árboles de análisis de antecesores) (Hernández M et al 2021). El genoma también permite estudiar los patrones de transmisión global, además de identificar mutaciones que tengan efecto en la transmisibilidad, la inmunidad, la patogénesis o la virulencia. Hasta ahora todos los organismos se clasifican en un ranking taxonómico hasta el rango de especie, sin embargo, la disponibilidad de la información contenida en su genoma propicia que se investigue la asignación a cepas, variantes o linajes. Esto es debido a que todos los aislados de una misma especie no son 100% idénticos en su composición nucleotídica, ya que aparecen mutaciones como un subproducto natural de la replicación viral que le pueden conferir al virus una ventaja competitiva. Los virus de ARN suelen tener una mayor tasa de mutación que los virus de ADN. Los coronavirus, sin embargo, tienen menor poder de mutación gracias a una enzima que corrige errores. Las mutaciones son cambios en la secuencia, que pueden ser puntuales (SNPs), o inserciones o delecciones cuando afectan a varios aminoácidos. Las mutaciones pueden originar sustituciones de aminoácidos y se denominan no sinónimas, o no alterar la secuencia aminoacídica de la proteína que codifican y se denominan sinónimas. Los genomas que difieren en su secuencia se denominan variantes y cuando esta variación implica un cambio de fenotipo se designan como cepas. Se puede considerar linaje como término sinónimo a variante, pero debe

cumplir una serie de características que entre otras son la de surgir de un linaje ancestral en otra población geográficamente distinta y exhibir una o más diferencias de nucleótidos con dicho linaje ancestral.

BIBLIOGRAFÍA

Eiros JM. Los virus emergentes y su impacto en la salud . Electron J Biomed 2022; 3.

Eiros JM, Hernández M. The evolution of SARS-CoV-2 variants and their clinical and healthcare implications. Rev Clin Esp (Barc). 2022; 222: 414-416. doi: 10.1016/j.rceng.2021.12.004.

Eiros JM, Inglada L, Martínez P, Ortiz De Lejarazu R, Orduña A, Rodríguez Torres A. Clasificación de los virus con importancia médica (II). Axis 1996; 48: 33-35.

Eiros JM, Inglada L, Martínez P, Ortiz de Lejarazu R, Orduña A, Rodríguez Torres A. Clasificación de los virus con importancia médica (III). Axis 1997; 49: 16-19.

Eiros Bouza JM, Bachiller Luque MR, Domínguez-Gil González M, Falcó Prieto A, Hernández Pérez M, Eiros Bachiller JM, Rojo Rello S, Pérez Rubio A. 100 cuestiones sobre virus emergentes. Gráficas Montseny, Barcelona. DL B 8840-2021. ISBN 978-84-123428-2-6. 2021: 80 pags.

Eiros Bouza JM, Del Pozo Pérez MA (Dirs). Infectología. Microbiología. Enfermedades Infecciosas. Monografía. En: Lorenzo A, Dueñas A, eds. DATA-MIR. Editora Médica Europea. ISBN 84-87336-19-1. Valladolid, 1993; 3: 1-75.

Eiros Bouza JM, Hernán García C, Simón Soria F, Castrodeza Sanz J. Enfermedades infecciosas emergentes asociadas a la inmigración. Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid 2007; 44: 9-25

Eiros Bouza JM, Hernández Novoa B, Ortega Lafont M. Cuestiones y Preguntas Comentadas en Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Eiros Bouza JM, editor. Mata. ISBN 84-605-9456-4. Valladolid, 1999, 75 pags

Eiros Bouza JM, Oteo Revuelta JA, Ortiz de Lejarazu R. Infecciones víricas por virus ADN y ARN. En: Perezagua Clamarigand C, Dir. Tratado de Medicina Interna. Editorial Ariel. ISBN 84-344-3716-3. Barcelona 2005; Vol II: 3229-3237.

Eiros Bouza JM, Pérez Rubio A. Ebola y otros virus emergentes. Aten Primaria 2015; 47: 31-33.

Eiros Bouza JM, Sánchez-Seco Fariñas MP. Enfermedades víricas emergentes. Punto de vista actual. Eidon. Revista de la Fundación de Ciencias para la Salud 2004; 16: 55-60.

García-Cruces J, López Izquierdo R, Domínguez-Gil M, López-Urrutia L, De Frutos M, Lorenzo B, Nogueira B, Puerta A, Fernández-Esgueva M, Merino I, Ramos Sánchez MC, Eiros JM. Análisis de la demanda de detección de SARS-CoV-2 en un área de salud de España [Analysis of the demand for detection of SARSCoV-2 in a health area of Spain]. Rev Esp Quimioter. 2020; 33: 422-429.

Hernández M, Abad D, Eiros JM, Rodríguez Lázaro D. Are animals a neglected transmission route of SARS-CoV-2? Pathogens 2020 9(6), 480; <https://doi.org/10.3390/pathogens9060480>

Hernández M, García Morán E, Abad D, Eiros JM. GISAID: iniciativa internacional para compartir datos genómicos del virus de la gripe y del SARS CoV-2. Rev Esp Salud Pública 2021;95:perspectivas15. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272021000100203&lng=es. Epub 04-Jul-2022.

Hernández M, Rodríguez Lázaro D, Eiros JM Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. Rev Argentina de Microbiología 2019 Nov 26. pii: S0325-7541(19)30081-1. doi: 10.1016/j.ram.2019.06.003 RAM-D-19-00023R2.

Inglada L, Eiros JM, Martínez P, O De Lejarazu R, Orduña A, Rodríguez Torres A. Clasificación de los virus con importancia médica (I). Axis 1996; 47: 33-36.

Rivero AM, Eiros JM, Rodríguez A, Navarro JF. Virus emergentes en Nefrología: Poliomavirus. Nefrología 2002; 22: 414-424.

Sánchez-Seco Fariñas MP, Muñoz García De Paredes P, Eiros Bouza JM. Viriasis emergentes. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ausina Ruiz V, Moreno Guillén, dirs. Editorial Médica Panamericana. ISBN 84-7903-921-3. Madrid, 2006: 1007-1013.