

Virus: ¿Qué son? ¿Qué hacen?

Una pequeña introducción al mundo de los virus

Héctor Martínez López

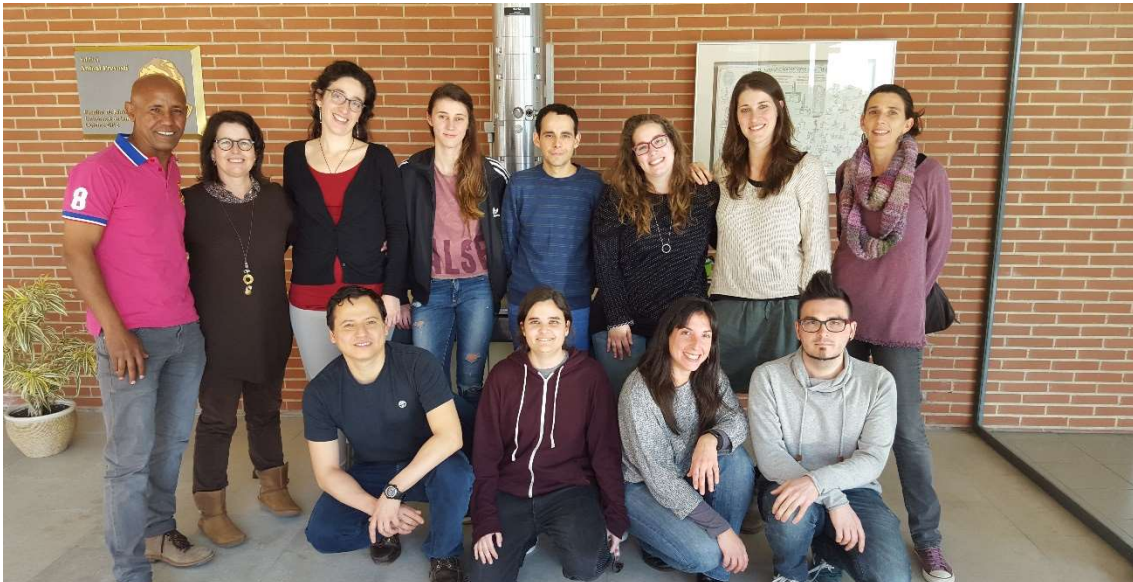


Ilustración 1. Componentes del Laboratorio de Virus contaminantes de Agua y Alimentos, ubicado en la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Rosina Girones, Sílvia Bofill-Mas, Marta Rusiñol, Ayalkibet Hundesa, Natalia Timoneda, Laura Guerrero, Eloy Gonzales Gustavson, David Aguado, Eva Forés, Xavier Fernandez Cassi, Sandra Martínez Puchol, Aiora Areguita

Imagen cedida por el Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua i Alimentos

http://www.ub.edu/microbiologia_virology/ca

Los virus

Todos oímos hablar de virus: virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus de la mononucleosis... Pero, ¿qué son los virus? ¿Están vivos? ¿Qué procesos llevan a cabo? ¿Todos son malos? ¿Por qué nos infectan? Todas estas preguntas, y muchas otras, se nos pueden ocurrir cuando pensamos en el término “virus”. En este trabajo no las responderemos todas, pero si daremos una pequeña visión sobre qué son los virus, qué hacen en nuestro cuerpo, etc.

¿Están vivos los virus?

La primera cosa que has de saber es que hay debate sobre si los virus son seres vivos o no, y viene de largo. La discusión está motivada, principalmente, por la definición de ser vivo.

El sector más tradicional en este aspecto considera que los seres vivos han de cumplir la teoría celular. Esta dice que la unidad básica de la vida es la célula, que estas han de nutrirse, reproducirse y relacionarse por sí mismas y que toda célula proviene de otra célula.

El otro sector defiende que los organismos vivos son aquellos que tienen material genético y que lo expresan de una manera u otra, sin las premisas de la teoría celular.

La visión tradicional deja fuera a muchos parásitos, puesto que no pueden vivir por sí solos, entre ellos los virus. La más moderna no es tan restrictiva y ubica estos parásitos dentro de los seres vivos. Poco a poco se van descubriendo nuevos virus, algunos de ellos muy grandes y similares a las células, pero sin dejar de ser parásitos.

¿Qué son los virus?

Normalmente, cuando queremos saber el significado de una palabra consultamos referencias como pueden ser Wikipedia o DIEC. Este último define los virus de la siguiente manera:

Virus

Individuo de un grupo de agentes infecciosos submicroscópicos, históricamente unidos por el hecho de no poder ser retenidos por filtros bacterianos, parásitos endocelulares obligados de plantas, animales y bacterias, que consta de un núcleo central constituido por ácido desoxirribonucleico o por ácido ribonucleico y rodeado por una cubierta de proteína o cápside.

Como bien dice el DIEC, los virus son “parásitos endocelulares obligados de plantas, animales y bacterias”, es decir, están obligados a vivir dentro de una célula. Pero, ¿por qué?

El núcleo vírico está compuesto por ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA). Estas moléculas son las que forman el material genético, que contiene la información

necesaria para la vida. Esta está contenida por los nucleótidos, que pueden ser 5: A, T, U, G, C. La T únicamente la encontramos en DNA y la U únicamente en RNA.

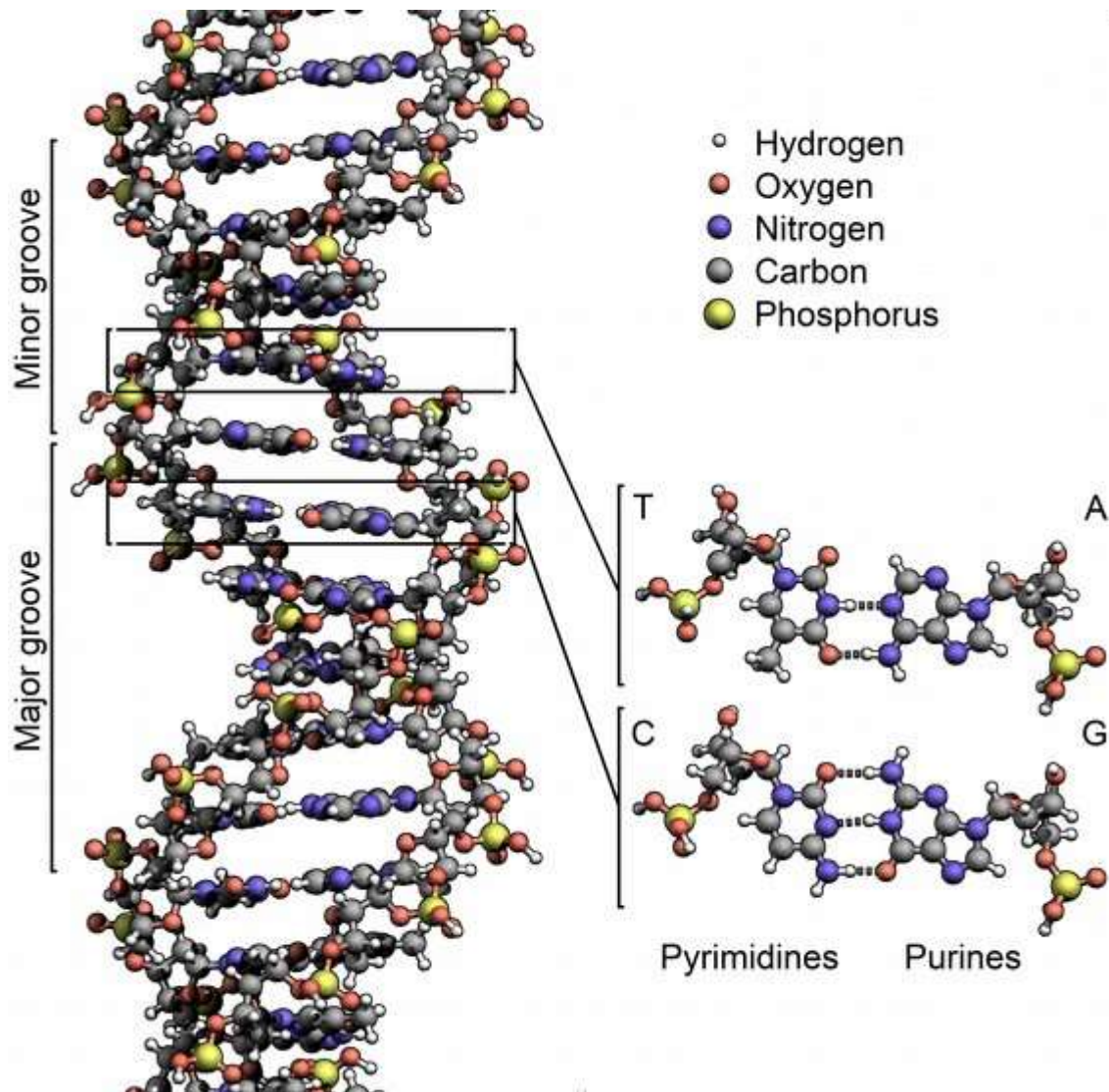


Ilustración 2. Estructura de doble hélice del DNA. Estructura de cómo se aparejan las dos cadenas, se puede ver, de manera simplificada, a la derecha de la representación. Muy similar, para el nivel que nos ocupa, a la estructura del RNA.

By Zephyris - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15027555>

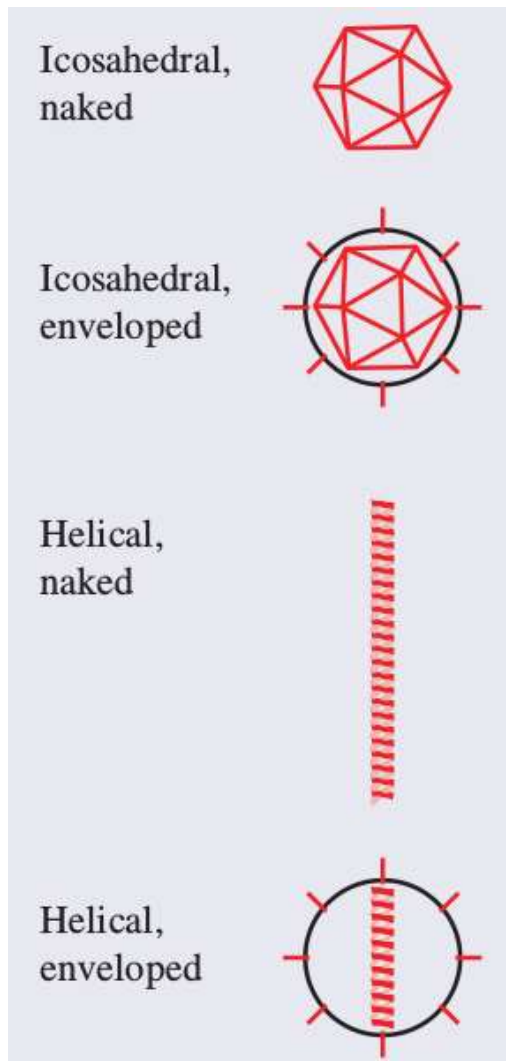
Según sea el orden de la secuencia de nucleótidos, contendrá una u otra información. Decimos que esta información está codificada en la secuencia.

Si ponemos el ejemplo de una célula, en su material genético viene codificada la información para fabricar diferentes proteínas, del orden de millares. Cada una de estas tiene una o más funciones que realizan dentro o fuera de la célula: rompen azúcares para conseguir energía, transportan agua dentro y fuera, forman el “esqueleto” celular, etc. También permiten duplicar su material genético y dividirse en dos hijas iguales.

Los virus no tienen codificada la información para muchas de estas proteínas, así que no pueden multiplicarse solos, ni conseguir energía, etc. Es por esta razón que tienen que infectar células. Cuando se encuentran dentro, secuestran las proteínas de la célula y las utilizan en beneficio propio, normalmente perjudicando la célula durante el proceso, así que hablamos de los virus como parásitos.

De manera general, un virus contacta con una célula específica y entra en su interior. Después secuestra las proteínas, las usa para duplicar su material genético y fabricar sus proteínas. Por

último, el virus lisa la célula – la rompe – y salen al exterior todas sus copias, conocidas como viriones, listas para infectar a otros huéspedes.



¿Cuál es la estructura de un virus?

Volviendo a hacer referencia a la definición del DICE, el virus tiene, además de material genético, una cubierta formada por proteínas, conocida también como cápside. Diferenciamos cuatro tipos de estructura de los viriones según su cápside:

- Icosaedros desnudos
- Icosaedros con envoltura
- Helicoidales desnudos
- Helicoidales con envoltura

Estudiando virus con estas estructuras se ha visto que se distribuyen según el tipo de material genético que puede ser, además de DNA o RNA, de doble cadena o de cadena simple.

La estructura del ADN o ARN es una cadena de nucleótidos que puede ser más o menos larga. Además, puede estar acompañada por su cadena complementaria, es decir, una cadena igual pero de orden inverso.

Il·lustració 3. Virus icosaedres nus, icosaedres embolcallats, helicoidals nus i helicoidals embolcallats, de dalt a baix.

By: John Carter and Venetia Saunders. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons Ltd. 2D Edition, 2013.

Cada nucleótido tiene su complementario, con quien puede establecer una relación razonablemente estable. Así, los nucleótidos A y T o U son complementarios de igual manera que lo son G y C

Por ejemplo, se ha visto que viriones icosaedros desnudos pueden contener todos los tipos de material genético mencionados: doble cadena y cadena simple de DNA y doble cadena y cadena simple de RNA.

Dependiendo del tipo de material genético y del tipo de cápside, el virus podrá tener más o menos información codificada y, por lo tanto, más o menos proteínas. El virus con el material genético – también conocido como genoma – más pequeño es el virus satélite del virus del tabaco, que tiene alrededor de 1 300 nucleótidos en una molécula de RNA de cadena simple. En cambio, los virus con el genoma más grande son los mimivirus, que llevan a tener hasta 1 200 000 nucleótidos en una molécula de DNA de cadena doble (1 200 000 cada cadena.)

Algunos viriones están envueltos, es decir, tienen su cápside proteica y otra capa por encima que los cubre. Esta segunda capa está formada por lípidos y contiene proteínas víricas que ayudan a reconocer las células que infectan.

Por ejemplo, el virus del herpes tiene este tipo de cubierta, así como el virus de la gripe o el virus de la inmunodeficiencia humana.

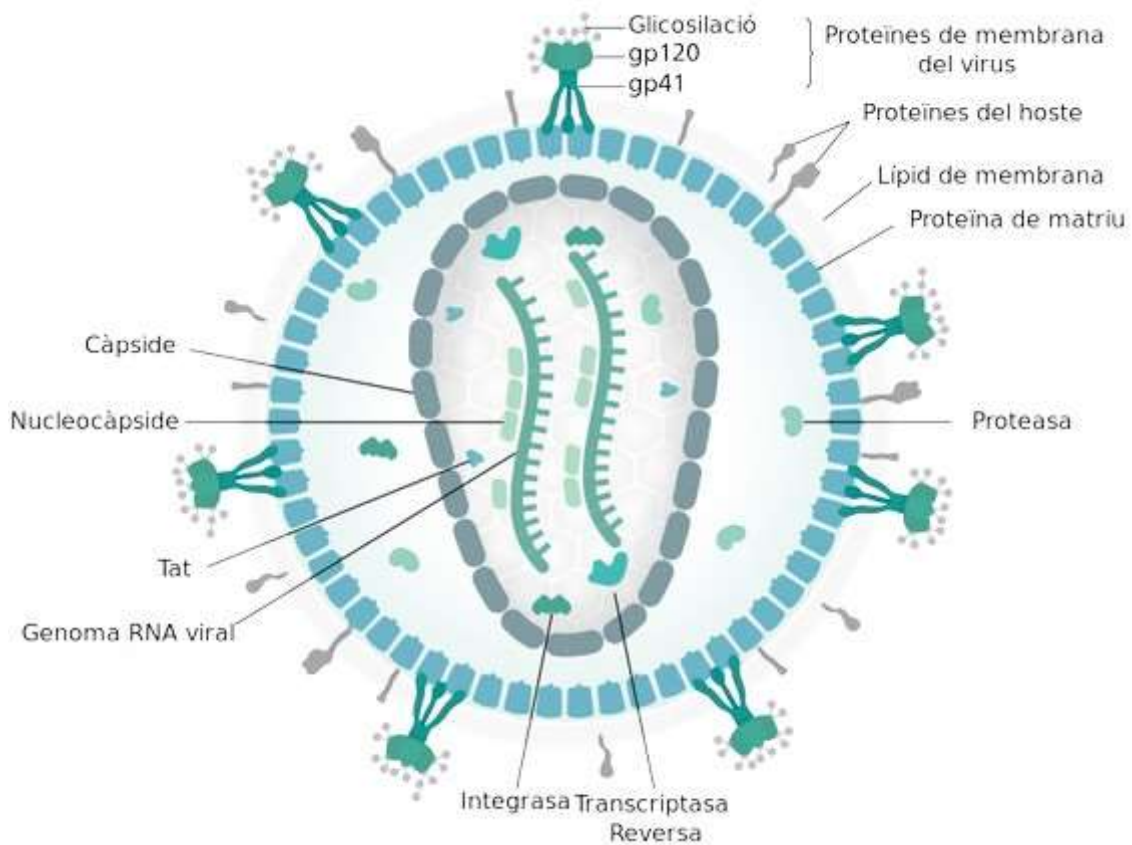


Ilustración 4. Estructura del virión del virus de la inmunodeficiencia humana (traducido). Se indican las diferentes proteínas del interior del virus, así como la cápside, la envoltura (lípidos de membrana), el material genético (Genoma RNA Viral), etc.

By Thomas Splettstoesser (www.scistyle.com) - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38751738>

¿Cómo entran los virus en las células?

Los viriones entran de diferentes formas en las células huésped dependiendo, sobretodo, de la presencia o ausencia de la envuelta lipídica.

Las células son capaces de capturar partículas de su entorno, secuestrarlas y procesarlas. Estas interactúan con proteínas que se encuentran en la membrana y activan mecanismos de internalización. Los viriones interactúan con estas proteínas de la membrana – conocidas como receptores – para entrar.

La célula, cuando captura estas partículas las destruye para aprovechar sus componentes – son unas maestras del reciclaje –, pero los viriones consiguen escapar. Todavía no se conoce muy bien como lo consiguen los virus desnudos, pero se conoce mucho mejor como lo hacen los envueltos.

Esta capa más externa está formada por lípidos, igual que las membranas de las células. Cuando estas capturan una partícula, lo hacen rodeándola con su propia membrana, dentro de una vesícula – una especie de burbuja – formada también por lípidos. Los viriones con envoltura fusionan esta con la vesícula, escapando de su destrucción. Otros fusionan su envuelta con la membrana de célula al contactar con los receptores, liberando su cápside al interior, sin ser internalizadas en vesículas.

¿Qué hacen los virus dentro de las células?

De manera general, el proceso de infección de un virus tiene los siguientes pasos:

1. Interacción y reconocimiento del virión y la célula.
2. Entrada a la célula.
3. Transcripción de los genes víricos a moléculas de RNA mensajero (mRNA).
4. Traducción de los mRNA en proteínas víricas.
5. Replicación del genoma del virus.
6. Montaje de las proteínas víricas y empaquetamiento del genoma, formando viriones.
7. Salida de los viriones de la célula.

Una vez ha entrado el virus, secuestra algunas proteínas celulares y bloquea el mecanismo básico de las células que hace que se suiciden cuando detectan alguna anomalía. Si el virus consigue bloquear este mecanismo, se podrá multiplicar.

La transcripción es el proceso por el cual el DNA pasa a mRNA – RNA mensajero –, que es utilizado para fabricar las proteínas. La traducción es el proceso por el cual la información del mRNA se convierte en proteínas.

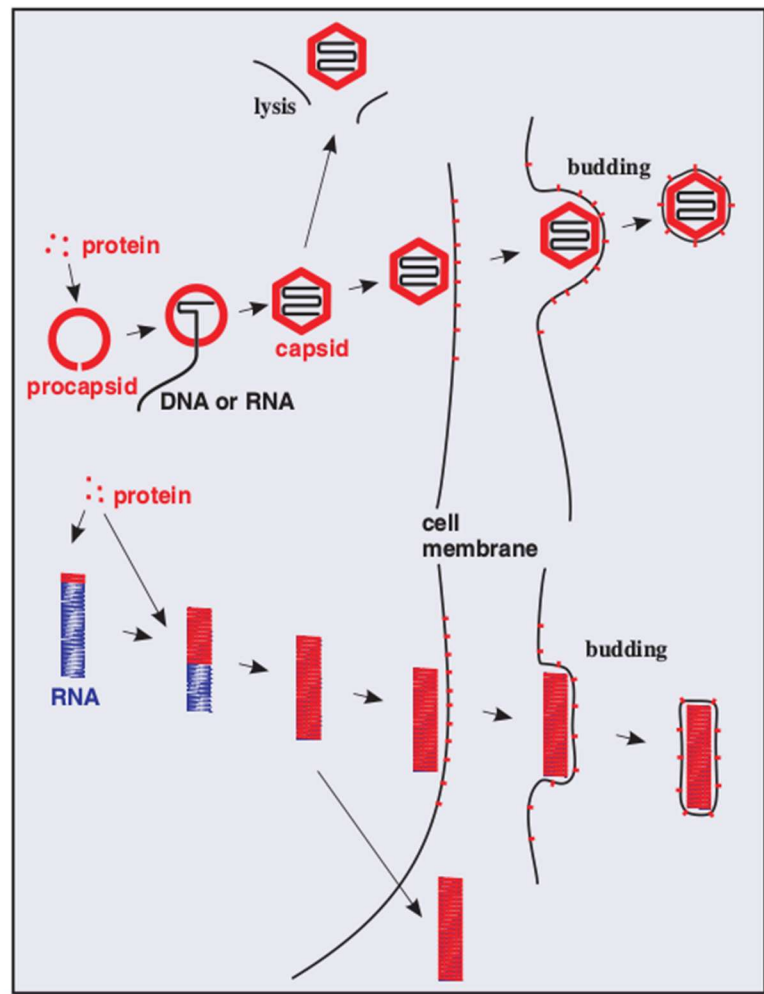
En ambos procesos participan proteínas que, de manera general, los virus no pueden contener por limitaciones de espacio en su genoma. Aun así algunos hay virus suficientemente grandes, como los mimivirus, que contienen algunas de estas proteínas, pero siguen siendo no autónomos y han de infectar células.

¿Cómo sale un virus de una célula?

Nos ponemos en situación: una célula ha estado infectada por un virión y el virus ya se ha multiplicado y ha formado nuevos viriones. ¿Cómo sale de dentro de la célula?

Los virus pueden salir de diferentes formas: lisando la célula, es decir, rompiéndola. Saliendo por un sistema llamado germinación, donde se llevan parte de la membrana. O bien, saliendo de manera directa.

Hemos de pensar que en este momento del ciclo del virus puede haber pocas decenas, centenares o miles de viriones dentro de la célula. Dependiendo de este número y de la estrategia utilizada para salir de la célula, esta puede morir o seguir funcional.



Il·lustració 5. Diferents formes de sortida dels virus. A dalt lisis, a la dreta budding (germinació, en anglès), a baix sortida directe.

By: John Carter and Venetia Saunders. *Virology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd. 2D Edition, 2013.

¿Qué hace realmente el virus?

Cuando se da una infección vírica hemos de sentarnos a hablar de que hace *realmente* el virus cuando entra. Hemos dicho que empieza a multiplicarse, pero no es del todo cierto. Hay diferentes comportamientos y opciones entre los virus: infecciones productivas o infecciones no productivas.

En las infecciones productivas, cuando el virión infecta la célula, puede darse la muerte celular por lisis y la liberación de viriones, la producción persistente de viriones sin que muera la célula o que el virus quede latente en la célula.

En las infecciones no productivas se puede dar el suicidio celular antes de que se produzcan viriones, que el virus tenga un defecto en su genoma y no pueda continuar o que la infección quede latente

La latencia es muy importante, puesto que algunos virus, como el de la inmunodeficiencia humana, quedan latentes un cierto tiempo para después mantener una producción persistente o lisar las células. Esto dificulta su detección, ya que los síntomas no son inmediatos.

¿Cómo responden los mamíferos frente a esta infección?

Los mamíferos tenemos un sistema inmune que nos protege delante de cuerpos extraños y agentes infecciosos, así que es de esperar que funcione contra los virus. Este sistema tiene diversos mecanismos que actúan uno delante del otro, como lo harían líneas de defensa. Pero los virus, unos poco a poco y otros más rápidamente, han desarrollado maneras de saltarse estas líneas defensivas.

La primera línea de defensa que encontramos es la inmunidad innata. Dentro de esta encontramos el sistema de complemento, un conjunto de proteínas que pueden inactivar viriones, bloquearlos, eliminar células infectadas... Algunos virus, como los herpesvirus, producen proteínas que son capaces de regular este sistema de complemento, evitando su activación.

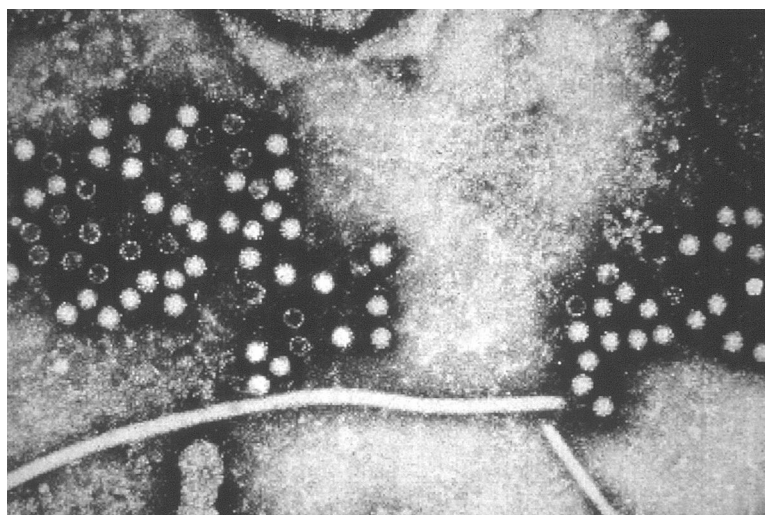
Dentro de la inmunidad innata también encontramos las células *Natural Killer* (NK). Estas son capaces de detectar cuando una célula está infectada por un virus y perforarle la membrana, matándola. Algunos virus, como el citomegalovirus, puede inhibir el reconocimiento de las células infectadas por parte de las NK.

La segunda línea de defensa que encontramos es la inmunidad adaptativa. Dentro de esta encontramos los anticuerpos que son capaces de adherirse a los viriones, neutralizándolos. También incrementan la probabilidad de estos viriones sean “comidas” por células especializadas.

Las células T son otra de las líneas de defensa de la inmunidad adaptativa. Estas son muy importantes para otros procesos como la síntesis de anticuerpos, activar la respuesta inmune, etc. También participan en la respuesta realizando un proceso similar al de las células NK. Reconocen y eliminan células infectadas para prevenir daños más graves. En este caso las conocemos como células T citotóxicas. Algunos virus, como los herpesvirus, también pueden evitar que las células que infectan sean reconocidas por células T citotóxicas.

¿Por qué son interesantes los virus para nosotros?

Convivimos con muchas formas de vida microscópicas, como bacterias y virus. Los podemos encontrar en el aire, en el agua, en los alimentos, encima de nuestra piel, dentro de nuestro cuerpo... El Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua y Alimentos de la Universidad de Barcelona trabaja en el ámbito de los virus contaminantes. Hemos hablado con Rosina Gironés, la líder del laboratorio.



Il·lustració 6. Micrografia electrònica de virus de l'hepatitis E.

By Transferred from en.wikipedia to Commons. This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #5605.

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1882568>

Rosina nos habla sobre las principales líneas en las que trabajan en el laboratorio: patógenos humanos que principalmente se transmiten por alimentos y agua, su transmisión y su determinación en aguas, etc.

Nos explica que buscan la presencia o ausencia de diversos virus característicos de humanos, ganado... para determinar si hay contaminación en una muestra y de donde proviene. Además nos cuenta cómo, utilizando estos virus indicadores, realizaron un estudio en diferentes países. [2, 3]

Le preguntamos por la relación con el grupo con ONGs, empresas, la Administración... Nos responde que han realizado algunos estudios sobre la efectividad de tratamientos en plantas depuradoras [4]. Además, gracias al conocimiento que posee el laboratorio y sus componentes, desarrollan técnicas baratas, rápidas y fiables relacionadas con virus, en colaboración con entidades como Intermon Oxfam, para mejorar su detección o eliminación [5].

Ponemos sobre la mesa el tema de los casos de infecciones víricas que han ocurrido hace pocos meses. Le pedimos que nos dé su opinión sobre si hay suficiente consciencia sobre la

contaminación vírica. Nos responde que, con casos como el de 3500 afectados por contaminación de agua de bebida, nos damos cuenta de que tenemos que vigilar más y que, poco a poco, las empresas van concienciándose un poco más sobre este tema. Con el tiempo, no será extraño que se implementen protocolos de detección de contaminación vírica en todos los ámbitos sensibles a este tipo de contaminación.

Otro tema con el trabajo el grupo es el estudio de virus emergentes. Rosina nos explica que uno de los que más están estudiando es el virus de la hepatitis E, que se creía inexistente en los países más desarrollados higiénicamente. De hecho, fueron uno de los grupos que estudiaron la distribución de este virus en países industrializados [6]. En otros estudios más recientes han demostrado que este virus puede transmitirse por ingestión de carne contaminada, de cerdo a humano [7].

Las actividades que llevan a cabo en el laboratorio son clave, ya que la contaminación vírica de agua no es trivial. La descontaminación en general, a día de hoy, está demasiado centrada en las bacterias. Pero ahora que tenemos más información sobre ellas y sabemos cómo mejorar su eliminación, aparecen los problemas relacionados con contaminación vírica. Conocer cómo se transmiten estos virus dentro de las aguas, cuál es su origen... es clave para poder mejorar la calidad del agua.

Para ampliar: dinámica de la contaminación en ríos [3]

En este estudio, el grupo trabajo realizando el seguimiento de la contaminación en ríos de 5 áreas muy diferentes: el río Negro (Brasil), el río Glafkos (Grecia), el río Tisza (Hungría), el río Llobregat (España) y el río Umeälven (Suecia). Determinando la presencia o ausencia de adenovirus i poliomavirus humanos, adenovirus porcinos y poliomavirus bovinos, estudiaron las fluctuaciones de la contaminación en estos ríos.

De esta manera vieron cómo cambia la contaminación según el caudal del río, la cantidad de personas en la zona urbana cercana, etc. Los resultados indicaron que la contaminación aumenta con la cantidad de población, pero disminuía con el caudal del río, ya que diluye la contaminación. Además, los niveles de contaminación fueron superiores en el agua después de abandonar la zona urbana. También pudieron diferenciar la contaminación de granja de la humana, ya que había niveles superiores en zonas agrícolas.

Con todo esto, el estudio demuestra que determinando la presencia o ausencia de unos pocos virus se pueden conseguir resultados muy buenos en regiones muy diferentes del mundo.

Para ampliar: Mejora de los filtros domésticos [5]

El tratamiento doméstico del agua es importante y necesario en muchas regiones del mundo donde las condiciones sanitarias del agua no son suficientes. Los filtros de agua cerámicos son ampliamente utilizados con este propósito y han demostrado que cumplen los estándares para eliminar contaminación bacteriana.

Aun así, estos filtros no cumplen los estándares para eliminar contaminación vírica, manteniendo la probabilidad de infección vírica y no mejorando, en ese aspecto, la calidad del agua. El laboratorio, gracias a sus conocimientos en el campo de los virus, ha colaborado con Intermon Oxfam en un proyecto para mejorar los filtros domésticos.

En el estudio buscaron mejorar la eliminación de virus manteniendo la eliminación bacteriana de los filtros. Con este objetivo modificaron las propiedades materiales del filtro a través de diferentes técnicas de cocción. Para medir la eliminación de virus de estos prototipos determinaron la presencia o ausencia de determinados microorganismos antes y después del filtraje. Consiguieron un filtro fabricado con un método de cocción en ambiente reductor que mantenía los estándares bacterianos, así como los víricos.

Innovar y mejorar las herramientas en este ámbito es imprescindible para mejorar la calidad del agua y, por lo tanto, de vida en las regiones con niveles de higiene baja.

Para ampliar: Metagenómica en aguas residuales [8]

La metagenómica es el estudio del conjunto de genomas, es decir, del material genético, de un determinado entorno directamente de las muestras del mismo. Tradicionalmente para saber qué especies de microorganismos poblaban una zona se recogían muestras y se intentaba cultivar en laboratorio, para luego hacer pruebas a los microorganismos que habían crecido. Pero existe un problema muy importante. ¿Y si hay algún microorganismo que no crece en el laboratorio? ¿Y si nadie lo sabe hacer crecer?

La metagenómica da solución a este problema. Al recoger muestras y buscar en ellas DNA sin cultivar, estamos analizando el material genético de todas las especies presentes en la muestra. Por lo tanto, no perdemos información. Además, permite descubrir nuevas especies, puesto que podemos encontrarnos con material genético que no coincida con ninguna otra especie conocida.

En el estudio, el laboratorio aplica esta técnica a aguas residuales, identificando 234 virus conocidos y clasificando otros no conocidos. Lo asombroso es que la mayoría de material genético estudiado no se corresponde a ninguna especie de virus conocida.

Esto demuestra la inmensidad del mundo de los virus, del cual conocemos tan solo una pequeña parte de las especies que lo conforman.

Para ampliar: Los virus en terapia génica

Los virus son muy buenos haciendo su trabajo: infectar células. Podemos pensar que por sí mismos no valdrían para dar terapia a nadie, puesto que provocarían enfermedades en vez de curarlas. Pero tenemos a nuestro alcance la tecnología y las herramientas que nos permiten modificar su material genético para hacerlos inoocuos y, además, que puedan curar algunas enfermedades.

La terapia génica como tal tiene el objetivo de curar o paliar una enfermedad utilizando, principalmente, material genético. ¿Cómo? Si una enfermedad está causada por el defecto de un solo gen, un solo pedazo de material genético del total que tenemos, podríamos pensar que corrigiendo el error se solucionaría el problema.

Aunque esto es más fácil de decir que de hacer, puesto que son muchas las barreras que dificultan el proceso y muchos elementos que pueden interferir. Los virus son muy buenos infectando células y aportando material genético para dividirse, y esto representa una ventaja de cara a aportar material genético a una célula.

Cuando utilizamos un virus para realizar una terapia génica le quitamos todos los elementos que hacían que se reprodujese y, por lo tanto, deja de ser patógeno y pasa a ser un “vector vírico”. Las técnicas de ingeniería genética que permiten volver inocuo al virus también nos permiten introducir en su genoma una copia corregida del material genético defectuoso. Cuando el virus entra en la célula, le inyecta este material y podrá curar o mejorar la enfermedad.

Los virus son importantes en este aspecto de la salud, puesto que encontramos enfermedades incurables. Actualmente hay pocas autorizaciones para utilizar terapia génica, aunque hay un gran número de ensayos clínicos en proceso. Normalmente, tanto tratamientos autorizados como ensayos, están destinados a casos extremos donde el paciente no ha respondido al tratamiento convencional y la enfermedad acabará con su vida. En un futuro no muy lejano, ¿quién sabe si podremos olvidar algunas enfermedades genéticas como ya hemos hecho con otras?

Cierre

En este artículo hemos hablado de virus: qué son, como viven y sobreviven, como el cuerpo se defiende de ellos y algunas de sus utilidades. Todavía queda mucho por aprender sobre virus, pero de lo que sabemos, no todo está incluido en el trabajo, ni está a un nivel profundo. Nos podríamos extender páginas y páginas, pero el objetivo de este artículo de divulgación es introducirnos al mundo de los virus, despertar vuestra curiosidad y que os fascinéis con estos pequeños microorganismos.

Agradecimientos

Queremos agradecer la colaboración de Rosina Gironés y del Laboratorio de Virus contaminantes de Agua y Alimentos, formado por: Rosina Girones, Sílvia Bofill-Mas, Marta Rusiñol, Ayalkibet Hundesa, Natalia Timoneda, Laura Guerrero, Eloy Gonzales Gustavson, David Aguado, Eva Forés, Xavier Fernandez Cassi, Sandra Martinez Puchol, Aiora Areguita. Muchas gracias a todos.

Más información sobre el grupo en http://www.ub.edu/microbiologia_virology/ca

Bibliografía:

1. Carter John B., Saunders Venetia A. **Virology: Principles and Applications**. 2ª edició. John Wiley & Sons Ltd, 2013. ISBN: 978-1-119-99143-4
2. Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R.. 2013. **Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples**. BioMed Research International.
3. Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, Ziros P, Kay D, Miagostovich M, Vargha M, Allard A, Vantarakis A, Wyn-Jones P, Bofill-Mas S, Girones R. 2014. **Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas**. Water Res. 59:119-29.
4. Rodriguez-Manzano, J, Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Moreno, Y., Amorós, I., Calgua, B., ... Girones, R.. 2012. **Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water**. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research, 66(12), 2517–2523.
5. Guerrero-Latorre L, Rusiñol M, Hundesa A, Garcia-Valles M, Martinez S, Joseph O, Bofill-Mas S, Girones R. **Development of improved low-cost ceramic water filters for viral removal in the Haitian context**. Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development In Press, Uncorrected Proof © IWA Publishing 2014
6. Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., Girones, R. 2003. **Epidemiological pattern of Hepatitis E Virus infection in industrialized countries**. *Emerging Infectious Diseases* 9(4):448-454
7. Riveiro-Barciela, M., Mínguez, B., Gironés, R., Rodríguez-Frías, F., Quer, J., Buti, M.. 2015. **Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion**. Journal of Clinical Gastroenterology, 49(2), 165-168.
8. Paul G. Cantalupo, Byron Calgua, Guoyan Zhao, Ayalkibet Hundesa, Adam D. Wier, Josh P. Katz, Michael Grabe, Roger W. Hendrix, Rosina Girones, David Wang, and James M. Pipas. 2011. **Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations**. mBio 2(5):e00180-11.