

Genómica al servicio de la salud: Tres años de pandemia viral *Genomics at the service of health: Three years of viral pandemic*

Resumen

Las pandemias virales han reforzado la importancia de las herramientas moleculares para el diagnóstico y control de enfermedades emergentes. La mejor forma de identificar, monitorear y determinar el grado de dispersión de las variantes virales es mediante el establecimiento de programas de vigilancia genómica. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha recomendado la vigilancia genómica de las variantes del SARS-CoV-2, a través de la secuenciación del genoma completo, la cual ha sido realizada de forma desigual entre los distintos países y regiones geográficas del mundo. En Venezuela hemos desarrollado una estrategia para la vigilancia genómica de este virus, basada en la secuenciación parcial del 2% del genoma, el uso de pruebas rápidas usando enzimas de restricción y la secuenciación de tercera generación (NGS) de genoma completo para la confirmación de las variantes e identificación de sub-linajes. La vigilancia genómica que desarrollamos en el IVIC nos ha permitido establecer protocolos de amplificación de genomas completos de otros virus emergentes de interés nacional, como el virus de la viruela símica (MPOX) y la Influenza Aviar, así como otros virus de importancia en salud pública como VIH, virus de hepatitis y arbovirus. La vigilancia genómica establecida en el país, puede además ser implementada a cualquier patógeno humano, animal o vegetal.

Palabras clave: Genómica; secuenciación; diagnóstico; virus emergentes, vigilancia genómica.

Abstract

Viral pandemics have strengthened the importance of molecular tools for the diagnosis and control of emerging infections. The best way of identifying, monitoring, and determining the degree of dispersal of viral variants is through genomic surveillance programs. The World Health Organization (WHO) has recommended genomic surveillance of the variants of SARS-CoV-2 through sequencing of the viral complete genome. This activity has been performed unevenly in different countries and geographic regions. In Venezuela, we developed a strategy for genomic surveillance of this virus, based on the partial sequencing of 2% of the genome, the use of rapid tests with restriction enzymes, and third-generation sequencing (NGS) of the whole genome to confirm variants and identify sublineages. The genomic surveillance developed at the IVIC has allowed us to establish complete genome amplification protocols for other emerging viruses of national interest, such as simian smallpox virus (MPOX) and avian influenza, as well as other viruses of public health importance such as HIV, hepatitis, and arboviruses. Genomic surveillance established in the country can also be applied to any human, animal, or plant pathogen.

Keywords: Genomics; sequencing; diagnosis; emerging viruses; genomic surveillance.

Introducción

Durante la evolución de un virus, la generación de mutaciones o cambio en el genoma, ocurre como un evento natural durante la replicación. Algunas mutaciones específicas definen los grupos genéticos virales o variantes que circulan actualmente en todo el mundo. Aunque la mayoría de las mutaciones no tiene ningún impacto, algunas pueden resultar en que el virus sea más transmisible, o facilitar su escape a la respuesta inmunológica (Cosar et al., 2022; Jaspe et al., 2021a; Pujol FH et al., 2020).

Las epidemias y pandemias virales han reforzado la importancia de las herramientas moleculares para el diagnóstico y control de enfermedades emergentes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y su versión cuantitativa, la PCR en tiempo real (qPCR), han representado una revolución en el campo biomédico y se han convertido en herramientas de rutina para el diagnóstico molecular de cualquier patógeno o enfermedad. La secuenciación genómica, particularmente la de última generación (Next Generation Sequencing, NGS por sus siglas en inglés), se ha vuelto igualmente el elemento indispensable para el manejo y caracterización de estas epidemias virales.

La mejor forma de identificar, monitorear y determinar el grado de dispersión de las variantes virales es mediante el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica de base genómica, en los cuales se apliquen tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, que permitan analizar el genoma viral completo, con la finalidad de detectar los perfiles mutacionales que caracterizan a cada variante (Rodríguez-Morales et al., 2020). La experiencia del Centro de Microbiología y Biología Celular (CMBC) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en el diagnóstico molecular y detección de mutaciones que confieren resistencia al tratamiento, de patógenos virales como el Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de hepatitis (VHA, VHB, VHC y VHE), y arbovirus, entre otros, nos permitió establecer programas pioneros en vigilancia genómica en Venezuela, no solo para afrontar la pandemia por el virus SARS-CoV-2, sino también evaluar molecularmente los brotes por otros virus emergentes como el poxvirus causante de la viruela símica, MPOX y recientemente el virus de influenza aviar.

Durante la pandemia por el SARS-CoV-2 han surgido linajes o variantes virales, con una habilidad incrementada para transmitirse y para evadir la inmunidad conferida por una infección previa o por las vacunas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2023). La aparición y extinción de variantes del SARS-CoV-2 es un proceso dinámico donde muchos factores virológicos, inmunológicos y sociales influyen en la dispersión y el mantenimiento del virus en una población. Un incremento en la transmisión de algunas variantes sobre otras, así como el escape a la inmunidad humoral reafirma la importancia de continuar con la vigilancia genómica y la caracterización molecular del SARS-CoV-2 (Tosta et al., 2023), haciendo este programa de vigilancia extensivo a otros patógenos.

En este estudio se presentará la experiencia en el IVIC en el diseño y establecimiento de un programa de vigilancia genómica de virus de importancia en salud pública, en apoyo al diagnóstico molecular del Instituto Nacional de Higiene Rafael

Rangel (INHRR), durante los tres años de pandemia de COVID-19 (2020-2023), en Venezuela.

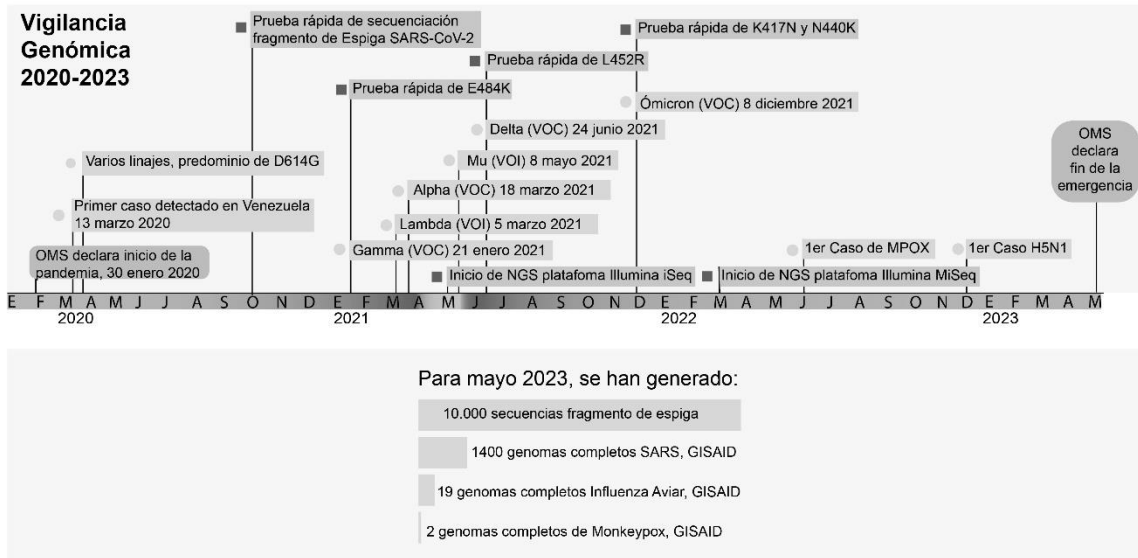
Estrategia de vigilancia genómica del Sars-CoV2

La enfermedad por coronavirus (COVID-19), es una enfermedad infecciosa provocada por el virus SARS-CoV-2, con más de 690 millones de casos y alrededor de un 1% de muertes en el mundo (Worldometer, 2023). Durante el extraordinario número de replicaciones del SARS-CoV-2, el virus ha ido acumulando mutaciones, las cuales permiten clasificarlo en distintos linajes, describiéndose a la fecha más de 2000 linajes y sublinajes virales. Algunos de estos linajes han sido definidos por la OMS como variantes virales, según los perfiles de constelaciones de mutaciones: variantes bajo vigilancia (VUM, por sus siglas en inglés), variantes de interés (VOI, por sus siglas en inglés), o variantes de preocupación (VOC, por sus siglas en inglés). Las VUMs presentan cambios genéticos que pueden representar un riesgo a futuro, sin evidencias fenotípicas o epidemiológicas de su impacto. Las VOIs contienen mutaciones que pueden conferir mayor transmisibilidad, resistencia a la inmunidad protectora y al tratamiento. La OMS ha descrito 5 VOCs, para las cuales se ha demostrado mayor transmisibilidad o riesgo de reinfección o menor eficacia de las vacunas o asociación con enfermedad más grave, con el subsecuente riesgo para la salud pública: la variante Alfa, linaje B.1.1. la cual emergió en el Reino Unido, la variante Beta en Sudáfrica, linaje B.1.351, la variante P.1 o Gamma, linaje B.1.28.1, que emergió en Brasil, la variante Delta en la India, linaje B.1.617.2, y la variante Omicrón, linaje B.1.1.529, la cual emergió en Sudáfrica (Jaspe et al. 2021a.; OMS, 2023a). Esta última variante causó preocupación inmediata, debido al aumento explosivo de casos en el país donde emergió, y la gran cantidad de mutaciones exhibidas por este nuevo linaje (Zambrano et al., 2022).

Entre los diversos aspectos sin precedentes ocurridos durante la pandemia del SARS-CoV-2, se puede resaltar la intensa vigilancia genómica llevada a cabo alrededor del mundo, con la generación de millones de secuencias de genomas completos puestos a disposición en bases de datos públicas, lo que ha permitido el seguimiento de la dispersión del virus. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha recomendado la vigilancia genómica de estas variantes, a través de la secuenciación del genoma completo (OMS, 2023; Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2023). Esta vigilancia ha sido realizada de forma desigual entre los distintos países y regiones geográficas del mundo. Algunos países han adoptado estrategias rápidas alternativas a la secuenciación masiva, para realizar de forma efectiva la vigilancia genómica en sus países. En el laboratorio de Virología Molecular del IVIC, desarrollamos una estrategia para la vigilancia genómica de este virus, basada en la secuenciación parcial del genoma mediante la amplificación de una región (2% del genoma total), el gen de la Espiga (S), para identificar sustituciones en el genoma que permiten diferenciar los diferentes linajes virales, complementada por secuenciación de tercera generación (NGS), para confirmación de las variantes e identificación de sub-linajes. A la fecha se han analizado más de 10.000 muestras por secuenciación parcial de una región de la espiga y generado más de 1.400 genomas completos (Figura 1). La correlación entre estas dos técnicas fue del 99% hasta la circulación de la variante Delta (Jaspe et al., 2021b; Jaspe et al., 2022a)

y mayor del 97% luego de la introducción de la variante Ómicron y sus múltiples sublinajes (Moros et al., 2023a). Todas las secuencias completas del genoma de las variantes de SARS-CoV-2 obtenidas en Venezuela están disponibles para el mundo en la base de datos disponible públicamente, GISAID, que es una iniciativa de ciencia global y la fuente primaria establecida en 2008 que proporciona acceso abierto a datos genómicos del virus influenza, SARS-CoV-2 y MPOX (GISAID, 2023).

Figura 1. Estrategia venezolana para la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 y línea de tiempo de detección de las variantes del SARS-CoV-2 y otros virus emergentes. Se muestra la introducción del SARS-CoV-2 y las diferentes variantes de preocupación (VOC) o de interés (VOI), así como otros patógenos virales de interés de salud pública como MPOX y el Virus de Influenza Aviar, durante el periodo entre la declaración de la pandemia por SARS-CoV-2 y fin de la emergencia declarado por la OMS. En la línea de tiempo se muestra con cuadrados, el establecimiento de las diferentes estrategias metodológicas desarrolladas en Venezuela durante los tres años de pandemia (2020-2023). Los círculos representan la primera detección de los virus mencionados, en Venezuela. Este ha sido el trabajo de un equipo numeroso de investigación, que comprende en una primera etapa el diagnóstico molecular de las infecciones por SARS-CoV-2 para identificar los casos positivos a ser usados en la vigilancia genómica, intentado analizar muestras de todos los estados de Venezuela, cada mes desde mediados del año 2020. Para el tamizaje inicial, se secuencian un pequeño fragmento del genoma (2% del genoma total), que contiene mutaciones claves para diferenciar las distintas variantes. Con pruebas rápidas usando enzimas de restricción se detectaron mutaciones de interés que permitieron identificar algunas variantes. Una vez identificada una variante, se confirma su circulación por la secuenciación del genoma completo. Se muestra la sucesión de las VOC y de las VOI que circularon en frecuencia más abundante en Venezuela en los tres años de pandemia (Loureiro et al., 2021; Jaspe et al., 2021b; Jaspe et al., 2021c; Jaspe et al., 2021d; Jaspe et al., 2022a; Jaspe et al., 2022b; Moros et al., 2023a).



Fuente: Elaboración propia del autor (2023).

Además, hemos desarrollado técnicas rápidas para la detección de mutaciones puntuales claves, mediante digestión con enzimas de restricción de un fragmento de PCR de la región del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus (aminoácidos 434-522 o aminoácidos 345-533), para identificar mutaciones claves: la E484K, mutación que podría reducir la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos por la vacunación, nos permitió detectar las variantes Gamma o Mu (Jaspe et al., 2021c), la mutación L452R asociada a una mayor transmisibilidad viral, nos permitió detectar la variante Delta (Jaspe et al., 2021d), y la presencia de las mutaciones K417N o N440K nos permitió detectar la introducción de la variante Ómicron al país (Jaspe et al., 2022b).

Nuestra estrategia ha permitido detectar y monitorear las variantes de preocupación (VOC) o de interés (VOI) que han circulado en Venezuela: VOC Gamma [primera detección 21-01-2021, última detección 29-11-2021], VOI Lambda [primera detección 05-03-2021, última detección 11-18-2021], VOC Alpha [primera detección 18-03-2021, última detección 03-10-2021], VOI Mu [primera detección 08-05-2021, última detección 17-12-2021], VOC Delta [primera detección 24-06-2021, última detección 15-03-2022] y la que está actualmente circulando en el país, la variante Omicron [primera detección 09-12-2021], y sus subvariantes [BA.1 a la BA.5] (Figura 1) (Loureiro et al., 2021; Jaspe et al., 2021b; Jaspe et al., 2022a; Moros et al., 2023a). La vigilancia genómica de muestras de viajeros internacionales que ingresaron a Venezuela no solo nos permitió detectar rápidamente la introducción de la variante Omicron en el país, sino además sugerir que estos podrían estar contribuyendo a la diversidad de las variantes que circulan en los países del mundo (Jaspe et al., 2022c).

Es probable que el SARS-CoV-2 se transforme en un virus endémico, como ha ocurrido con otros coronavirus dentro de la misma familia. Resulta importante saber qué características genéticas se mantendrán y cuáles se extinguirán en el genoma viral; para ello es indispensable conocer la historia evolutiva del virus y sus patrones de dispersión, por eso la importancia de continuar con la vigilancia genómica de este virus. Aunado a lo anterior y como ya fue mencionado la estrategia de vigilancia genómica que

desarrollamos en el IVIC nos ha permitido establecer protocolos de amplificación de genomas completos de otros virus emergentes de interés nacional como MPOX e Influenza Aviar y otros virus de importancia en salud pública como VIH, virus de hepatitis y arbovirus.

Primer caso de viruela símica en el país

El virus de la viruela del simio en humanos causada por MPOX, es una enfermedad zoonótica desatendida y se identificó por primera vez en 1959. Desde entonces, la incidencia de la enfermedad ha sido esporádica. Las regiones endémicas se identificaron en las áreas central y occidental de África, sin embargo, la infección comenzó a propagarse en 2017 a regiones no endémicas como América del Norte y del Sur, Europa y Asia. MPOX tiene un reservorio animal, probablemente roedores, e infecta a humanos a través de eventos zoonóticos y luego por contacto humano a humano (Zhu et al., 2022; Moros et al., 2023b).

En mayo de 2022, se confirmaron brotes del MPOX fuera del continente africano. Los primeros casos detectados fueron en el Reino Unido, relacionados con viajeros que regresaban de Nigeria, un país africano que históricamente ha reportado casos de viruela del simio. Este brote se ha extendido a otros países de Europa, América, Asia, Australia y otros países africanos. El 23 de Julio de 2022, la OMS declara esta epidemia como Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional. Para mediados de mayo 2023 se han reportado más de 83 mil casos de esta infección (OMS, 2022). El INHRR de Venezuela implementó un algoritmo para la detección molecular de casos de MPOX y descarte serológico de otras infecciones inductoras de exantema confusas. Dicho algoritmo demostró ser útil para el seguimiento y detección del primer caso causado por este virus en Venezuela en junio de 2022, de una persona que viajó y adquirió la infección en el exterior del país (D'Angelo et al., 2022).

Las secuencias de MPOX se clasifican en dos clados: el clado I, anteriormente conocido como clado de África Central, es la variante más patógena, con una tasa de mortalidad de alrededor del 10% y responsable del primer caso humano documentado de MPOX en 1970, y el clado II (anteriormente conocido como el clado de África Occidental), que exhibe una significativa menor patogenicidad (Moros et al., 2023b). La secuenciación genómica de este virus, que contiene casi 200.000 pares de bases, ha permitido identificar el surgimiento de linajes: La divergencia observada en los aislados de MPOX durante el transcurso del brote internacional, ha permitido clasificar este linaje en 8 sublinajes: B1.1 a B1.9, resaltan en la región los sub-linajes B.1.6 peruano y el B.1.9 colombiano (Chakraborty et al., 2022).

La mayoría de las secuencias del brote internacional de MPOX se agrupan en el clado IIb, linaje B.1, mientras que algunas secuencias de casos en EE. UU. de 2022 pertenecen al linaje A.1 (Luna et al., 2022). Los primeros casos venezolanos de MPOX se clasificaron como clado II tanto por qPCR, con los cebadores específicos de clado, como por secuenciación parcial del genoma. De acuerdo con el historial de viaje y la fecha del primer caso en el país, la secuencia debe agruparse dentro del linaje B.1 (D'Angelo et al., 2022).

En Venezuela, se han identificado una docena de casos. La NGS ha permitido obtener la secuencia de dos genomas virales, permitiéndolos ubicar en el clado II, linaje

B (D'Angelo et al., 2022). Se está en proceso de generar otras secuencias de genomas completos de MPOX.

Otros virus de importancia en salud pública en Venezuela

El manejar las capacidades de NGS nos permite enfrentar nuevos retos de virus emergentes.

Un ejemplo de ello es la Influenza aviar. La gripe aviar es un término genérico, que describe la enfermedad causada por diversos tipos del virus de influenza que infectan aves y que ocasionalmente puede causar brotes de enfermedad vírica en humanos, de extrema peligrosidad. Los virus de Influenza A pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*, su genoma está compuesto por 8 segmentos de ARN. Presentan una alta tasa de mutación y se clasifican en subtipos según las características genómicas y antigénicas de las proteínas de Hemaglutinina y Neuraminidasa que contienen, que tienen impacto en la virulencia. Cualquier estrategia implementada para el control del virus de influenza, que no tome en cuenta la identificación precisa de los subtipos, podría proporcionar resultados inadecuados, ya que la eficacia de la intervención varía según los subtipos circulantes. Por tanto, el manejar capacidades de secuenciación masiva (NGS) nos permite enfrentar nuevos retos en la caracterización de virus emergentes. A pesar de su alta variabilidad, una característica muy peculiar de estos virus es que todos los subtipos virales presentan extremos genómicos altamente conservados, tanto los 8 segmentos como todos los subtipos (Zhou et al., 2009). En el Laboratorio de Virología Molecular, disponíamos de los cebadores para la amplificación y secuenciación de genomas de Influenza estacional. Al presentarse la emergencia de Influenza aviar en el mundo y los casos de pelícanos afectados en el país, el disponer de estas herramientas nos permitió realizar NGS en muy corto tiempo y así confirmar la circulación de H5N1 (clado 2.3.4.4b) en pelícanos localizados en costas venezolanas, constituyendo el primer reporte de gripe aviar en nuestro país y siendo Venezuela el primer país de Suramérica en publicar las secuencias del genoma completo a disposición de pares en una base de datos pública como GISAID (Ruiz-Saenz, Martinez-Gutierrez, y Pujol, 2023).

Otros virus de gran importancia en Salud Pública que abordamos son, entre otros, los virus de hepatitis, el VIH-1 y los arbovirus, tales como el virus dengue, Chikungunya, Zika y Fiebre Amarilla.

Conclusión

A lo largo de la pandemia del SARS-CoV2 el surgimiento de variantes virales resaltó la importancia de la vigilancia genómica viral, que se basa en la secuenciación del genoma completo de aislados virales. La búsqueda, detección y caracterización molecular de las variantes circulantes en nuestro país, permitió la toma de decisiones en relación al manejo de casos positivos, basados en las recomendaciones e informaciones emanadas por la OMS en relación a las características de estas variantes.

En Venezuela adoptamos dos estrategias de secuenciación para la vigilancia genómica: una rápida, con información de solo el 2% del genoma que permitió realizar un tamizaje de un gran número de muestras, y la segunda, anclada a la primera, para

obtener el genoma completo por NGS. Así como también, pruebas más rápidas para toma de decisiones puntuales, mediante el uso de enzimas de restricción, para identificar mutaciones características de una o más variantes. La experiencia en la generación de genomas completos, como parte de la vigilancia genómica, ha permitido abordar con éxito a otros virus emergentes de interés nacional y otros virus de importancia en salud pública. Estos estudios contribuyen a la detección precoz y así a disminuir la diseminación de estas enfermedades. La sucesión de epi/pandemias desde 2020 nos muestra cuán vulnerables estamos ante el surgimiento de enfermedades emergentes y cuán importante es asimilar las lecciones aprendidas, desde el manejo de estas herramientas moleculares hasta la concientización de la importancia del concepto de una sola salud.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a todos los equipos de salud involucrados en la vigilancia, control y atención de todos los pacientes afectados por estas emergencias virales, en especial a los grupos de diagnóstico de la COVID-19 en Venezuela, coordinado por el INHRR, con especial mención al grupo del IVIC (grupo CoViMol). Estos trabajos fueron financiados por el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología (MinCyt). Se agradecen igualmente los aportes de la Oficina Panamericana Sanitaria (OPS) y al proyecto Diálogo sobre la Pandemia, dirigido por el Instituto Charité de Berlin y financiado por el Ministerio de Asuntos Extranjeros de Alemania.

Referencias

- Chakraborty, C.; Bhattacharya, M.; Sharma, A. R. y Dhama, K. (2022). Evolution, epidemiology, geographical distribution, and mutational landscape of newly emerging monkeypox virus. *GeroScience*, 44(6), 2895–2911. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00659-4>
- Cosar, B.; Karagulleoglu, Z. Y.; Unal, S.; Ince, A. T.; Uncuoglu, D. B.; Tuncer, G.; Kilinc, B. R.; Ozkan, Y. E.; Ozkoc, H. C.; Demir, I. N.; Eker, A.; Karagoz, F.; Simsek, S. Y.; Yasar, B.; Pala, M.; Demir, A.; Atak, I. N.; Mendi, A. H.; Bengi, V. U.; Cengiz Seval, G. y Demir-Dora, D. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. *Cytokine & growth factor reviews*, 63, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>
- D'Angelo, P.; Loureiro, C. L.; Jaspe, R. C.; Sulbaran, Y. F.; Rodríguez, L.; Alarcón, V.; García, J. M.; Zambrano, J. L.; Liprandi, F.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2022). First Case of Monkeypox in Venezuela: Partial Complete Genome Sequence Allowed Its Grouping into the West African Clade II. *Tropical medicine and infectious disease*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010002>.

- GISAIID, Iniciativa global para compartir los datos de los virus gripales. Disponible online: <https://gisaid.org/> (acceso el 26 de Mayo de 2023).
- Jaspe, R. C.; Zambrano, J. L.; Loureiro, C. L.; Sulbaran, Y.; Moros, Z. C.; Garzaro, D.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2021a). Biología y diversidad genética del SARS-CoV-2, agente causal de la COVID-19. *Salus*, 25(3), 15–18. <https://doi.org/10.54139/salus.v25i3.127>
- Jaspe, R. C.; Loureiro, C. L.; Sulbaran, Y.; Moros, Z. C.; D'Angelo, P.; Rodríguez, L.; Zambrano, J. L.; Hidalgo, M.; Vizzi, E.; Alarcón, V.; Aguilar, M.; Garzaro, D. J.; CoViMol Group, Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2021b). Introduction and rapid dissemination of SARS-CoV-2 Gamma Variant of Concern in Venezuela. *Infection, genetics and evolution*, 96, 105147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105147>
- Jaspe, R. C.; Sulbaran, Y.; Loureiro, C. L.; D'Angelo, P.; Rodríguez, L.; Garzaro, D. J.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2021c). Importance of mutations in amino acid 484 of the Spike protein of SARS-CoV-2: rapid detection by restriction enzyme analysis. *Investigación Clínica*, 62 (Suppl.2), 18-26. <https://doi.org/10.22209/IC.v62s2a02>.
- Jaspe, R. C.; Sulbaran, Y.; Hidalgo, M.; Loureiro, C. L.; Moros, Z. C.; Garzaro, D. J.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2021d). A simple method for detection of mutations in amino acid 452 of the Spike protein of SARS-CoV-2 using restriction enzyme analysis.: Un método simple para la detección de mutaciones en el aminoácido 452 de la proteína de la Espiga del SARS-CoV-2, usando análisis de enzimas de restricción. *Investigación Clínica*, 62(4), 371-377. <https://doi.org/10.22209/IC.v62n4a07>
- Jaspe, R. C.; Loureiro, C. L.; Sulbaran, Y.; Moros, Z. C.; D'Angelo, P.; Hidalgo, M.; Rodríguez, L.; Alarcón, V.; Aguilar, M.; Sánchez, D.; Ramírez, J.; Garzaro, D. J.; Zambrano, J. L.; Liprandi, F.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2022a). Description of a One-Year Succession of Variants of Interest and Concern of SARS-CoV-2 in Venezuela. *Viruses*, 14(7), 1378. <https://doi.org/10.3390/v14071378>
- Jaspe, R. C.; Zambrano, J. L.; Hidalgo, M.; Sulbarán, Y.; Loureiro, C. L.; Moros, Z. C.; Garzaro, D. J.; Liprandi, F.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2022b). Detection of the Omicron variant of SARS- CoV-2 by restriction analysis targeting the mutations K417N and N440K of the spike protein.: Detección de la Variante Ómicron del SARS-CoV-2 por análisis de restricción de dos mutaciones de la proteína de la espiga. *Investigación Clínica*, 63(1), 92-99. <https://doi.org/10.54817/IC.v63n1a08>

- Jaspe, R. C.; Sulbaran, Y.; Loureiro, C. L.; Moros, Z. C.; Marulanda, E.; Bracho, F.; Ramírez, N. A.; Canonico, Y.; D'Angelo, P.; Rodríguez, L.; Castro, J.; Liprandi, F.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2022c). Detection of the Omicron variant of SARS-CoV-2 in international travelers returning to Venezuela. *Travel medicine and infectious disease*, 48, 102326. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102326>
- Loureiro, C. L.; Jaspe, R. C.; D' Angelo, P.; Zambrano, J. L.; Rodríguez, L.; Alarcón, V.; Delgado, M.; Aguilar, M.; Garzaro, D.; Rangel, H. R. y Pujol, F. H. (2021). SARS-CoV-2 genetic diversity in Venezuela: Predominance of D614G variants and analysis of one outbreak. *PloS one*, 16(2), e0247196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247196>
- Luna, N.; Ramírez, A. L.; Muñoz, M.; Ballesteros, N.; Patiño, L. H.; Castañeda, S. A.; Bonilla-Aldana, D. K.; Paniz-Mondolfi, A. y Ramírez, J. D. (2022). Phylogenomic analysis of the monkeypox virus (MPXV) 2022 outbreak: Emergence of a novel viral lineage?. *Travel medicine and infectious disease*, 49, 102402. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102402>
- Moros, Z.C.; Zambrano, J.L.; Sulbaran, Y.F.; Loureiro, C.L.; Marulanda, E.; Bracho, F.; D'Angelo, P.; Rodriguez, L.; Liprandi, F.; Rangel, H.R.; Jaspe, R.C. y Pujol, F.H. (2023a). Dissemination of the Omicron Variant and Its Sub-lineages among Residents and Travelers in Its First Year of Emergence in Venezuela.; *Preprints* 2023051361. <https://doi.org/10.20944/preprints202305.1361.v1>
- Moros, Z. C.; Loureiro, C. L.; Jaspe, R. C.; Sulbarán, Y.; Delgado, M.; Aristimuño, O. C.; Franco, C.; Garzaro, D. J.; Rodríguez, M.; Rangel, H. R.; Liprandi, F.; Pujol, F. H. y Zambrano, J. L. (2023b). Web-tools for the genomic analysis of the 2022 Monkeypox virus global outbreak.: Herramientas web para el análisis genómico del virus de la viruela símica durante el brote mundial de 2022. *Investigación Clínica*, 64(1), 68-80. <https://doi.org/10.54817/IC.v64n1a06>
- Organización Mundial de la salud [OMS] (2022). Director-General Declares the Ongoing Monkeypox Outbreak a Public Health Emergency of International Concern. Disponible online: <https://www.who.int/europe/news/item/23-07-2022-who-director-general-declares-the-ongoing-monkeypox-outbreak-a-public-health-event-of-international-concern> (acceso el 25 de Agosto del 2022).

- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2023). Tracking SARS-CoV-2 variants. Disponible online: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. (acceso el 26 de Mayo de 2023).
- Organización Panamericana de la Salud [OPS] (2023). Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19. Disponible online: <https://www.paho.org/es/temas/influenza-otros-virus-respiratorios/red-regional-vigilancia-genomica-covid-19>. (acceso el 26 de Mayo de 2023).
- Pujol, F. H.; Zambrano, J. L.; Jaspe, R. C.; Loureiro, C. L.; Vizzi, E.; Liprandi, F. y Rangel, H.R. (2020). Biología y evolución del coronavirus causante de la COVID-19. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 40:63-73.
- Rodríguez-Morales, A. J.; Balbin-Ramon, G. J.; Rabaan, A. A.; Sah, R.; Dhama, K.; Paniz-Mondolfi, A.; Pagliano, P. y Esposito, S. (2020). Genomic Epidemiology and its importance in the study of the COVID-19 pandemic. *Le infezioni in medicina*, 28(2), 139–142.
- Ruiz-Saenz, J.; Martinez-Gutierrez, M. y Pujol, F. H. (2023). Multiple introductions of highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.4.4b into South America. *Travel medicine and infectious disease*, 53, 102591. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102591>
- Tosta, S.; Moreno, K.; Schuab, G.; Fonseca, V.; Segovia, F. M. C.; Kashima, S.; Elias, M. C.; Sampaio, S. C.; Ciccozzi, M.; Alcantara, L. C. J.; Slavov, S. N.; Lourenço, J.; Cella, E. y Giovanetti, M. (2023). Global SARS-CoV-2 genomic surveillance: What we have learned (so far). *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 108, 105405. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105405>
- Woldometer, datos pandémicos del COVID-19 (2023). Disponible online: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>, (acceso el 26/05/2023)
- Zambrano, J.L.; Jaspe, R.C.; Hidalgo, M.; Loureiro, C.L.; Sulbaran, Y.F.; Moros, Z.C.; Garzaro, D.J.; Vizzi, E.; Rangel, H.R.; Liprandi, F. y Pujol, F.H. (2022). Sub-lineages of the Omicron variant of SARS-CoV-2: characteristic mutations and their relation to epidemiological behavior.: Sub-linajes de la variante Ómicron del SARS-CoV-2: mutaciones características y su relación con el comportamiento

<https://doi.org/10.54817/IC.v63n3a05>

Zhou, B.; Donnelly, M. E.; Scholes, D. T.; St George, K.; Hatta, M.; Kawaoka, Y. y Wentworth, D. E. (2009). Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *Journal of virology*, 83(19), 10309–10313. <https://doi.org/10.1128/JVI.01109-09>

Zhu, M.; Ji, J.; Shi, D.; Lu, X.; Wang, B.; Wu, N.; Wu, J.; Yao, H. y Li, L. (2022). Unusual global outbreak of monkeypox: what should we do?. *Frontiers of medicine*, 16(4), 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11684-022-0952-z>