

Informe final

Caracterización Genómica del Virus Respiratorio Sincitial (VRS) en España. Temporada 2024-2025

**Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios,
Laboratorios colaboradores, Red Secuenciación Genómica
RELECOV, Unidad de Genómica del ISCIII, Unidad de Bioinformática
del ISCIII**

Instituto de Salud Carlos III



Parcialmente financiado con fondos Europeos del Programa EU4Health
Número de proyecto 101113109 — RELECOV 2.0

Autorías

Laboratorio de Referencia e Investigación de Virus Respiratorios

María Iglesias-Caballero*
Germán Vallejo
Vicente Mas
Albert Campoy
Sara Camarero Serrano
Silvia Moreno
Olga Cano

Noelia Reyes
Mar Molinero
Jose Antonio Infantes
Sonia Vázquez
Francisco Pozo
Inmaculada Casas *

Laboratorios colaboradores y RELECOV

Autores con contribución intelectual directa y activa en la elaboración del informe:

Ana Cosmen
Ana Navascués
Andrés Antón
Carmen Roman
Cristina Calvo
Eduardo Lagarejos
Fernando González Candelas
Guadalupe Rodríguez
Jordi Reina
Jose María García Aguayo
Laura Moreno Parrado

María Gil Fortuño
María Luz García
Mercedes Rodríguez Pérez
Milagrosa Montes
Mónica Gozalo
Montserrat Ruiz
Nieves de Gonzalo
Nieves Gutierrez
Octavio Carretero García
Raquel Soria

Autores con contribución de soporte con secuencias depositadas en GISAID:

Alberto Molares
Alberto Vázquez
Alejandra González-Sánchez
Alejandro Sanz Carbonell
Ana Fernández González
Antonio Garcia-Villanueva
Begoña Fuster Escrivá
Carlos Daviña
Carlos Valiente Mullor
Carme Salvador García
Carmen Gonzalez
Concepción Gimeno Cardona
Cristina Andrés
Cristina Gaona
Cristina Ochoa-Varela
D Vicente
Elie Dahdouh
Federico García
Fernando González Candelas
Fernando Lázaro
Francisco José Rodríguez Nortes
Gema Barbeito

Germán Bou
Ignasi Prats
Irene Pedrosa
Iria Sendon Sanvicente
Iván Bloise
Javier Pérez Florido
Jesús Mingorance Cruz
JM Marimon
Jorge Arca-Suarez
Jose Antonio Boga
Jose Antonio Lepe
Jose María González-Alba
Juan A. Vallejo
Juan Alberola Enguñados
Juan J. Camarena Miñana
Karen García-Comuñas
L Piñeiro
Laura Sante
Lidia Ruiz Roldán
M Rekalde
María Carmen Martín
María Dolores Ocete

María Dolores Tirado Balaguer
Maria Jose Gude
Maria Jose Muiño Andrade
María Lara
María Luisa Pérez del Molino
Maria Neiva Baroso-Garcia
María Reyes Vidal-Acuña
Marta Elena Álvarez-Argüelles
Matilde Trigo
Mercedes Rodríguez-Pérez
Nieves Larrosa
Noelia Lozano Rodríguez
P Vallejo
Pablo Aja-Macaya

Pablo Camacho
Rafael Medina González
Regina Antoni Alandes
Rocio Trastoy
Rosa González Pellicer
Santiago Melón
Sara Sanbonmatsu
Sonia Cortés Badenes,
Sonia Pérez-Castro
Soraya Rumbo-Feal
Susana Rojo-Alba
Teresa Lopez Valiño
Xosé Costa
Zulema Pérez-Martínez

Unidad de Genómica ISCIII

Pilar Jiménez Sancho,
Joanna A. Luczkowiak
María Luisa Navarro Rico

Unidad de Bioinformática ISCIII

Sarai Varona
Alejandro Bernabéu
Victor Manuel Lopez
Juan Ledesma
Sara Monzón
Isabel Cuesta

* Autoras responsables del informe y contacto:

M. Iglesias (miglesias@isciii.es) / I. Casas (icasas@isciii.es)

Índice

INTRODUCCIÓN	5
METODOLOGÍA.....	6
RESULTADOS.....	8
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	21

INTRODUCCIÓN

El virus respiratorio sincitial (VRS) es la principal causa de infección de las vías respiratorias inferiores en la población pediátrica menor de un año (1) y una de las principales en la población adulta mayor de 65 años (2). Debido a su elevada carga sanitaria, organismos internacionales de salud pública, como el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3,4), recomiendan su inclusión en los sistemas de vigilancia epidemiológica y virológica para el control de las infecciones respiratorias virales.

Siguiendo estas recomendaciones, en España se inició en la temporada 2020-2021 la implementación del Sistema de Vigilancia de Infección Respiratoria Aguda (SiVIRA), tanto en el ámbito de la atención primaria como en el hospitalario, para la vigilancia de infección respiratoria aguda leve (IRAs), y grave (IRAG) respectivamente (5). Este sistema integral de vigilancia tiene un doble objetivo: por un lado, monitorizar la evolución de las IRAs e IRAG mediante un componente sindrómico; y por otro, vigilar específicamente la circulación de los virus de la gripe, SARS-CoV-2 y VRS mediante la selección sistemática de una muestra de pacientes para el diagnóstico microbiológico de los tres virus.

Asimismo, la OMS ha señalado la necesidad de avanzar hacia una nomenclatura y clasificación estandarizadas del VRS con el fin de facilitar la integración de la información virológica, genómica y epidemiológica en los sistemas de vigilancia (6).

En España, la Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud aprobó el uso de nirsevimab en la temporada 2023-2024 para la población infantil con alto riesgo de enfermedad grave por VRS, así como para los menores de 6 meses al inicio o durante la temporada de circulación de VRS, es decir, aquellos nacidos entre el 1 de abril y el 31 de marzo de del año siguiente (7). La introducción de nuevas medidas de prevención frente al VRS, como los anticuerpos monoclonales de vida media prolongada y las vacunas aprobadas, o en vías de evaluación/aprobación por la Agencia Europea del Medicamento (8), hace necesario reforzar la vigilancia virológica mediante herramientas robustas, entre ellas la secuenciación del genoma viral. Estas aproximaciones permiten monitorizar la evolución de los VRS en el contexto de las nuevas estrategias de control y prevención.

El VRS es un virus envuelto perteneciente al género *Orthopneumovirus* dentro de la familia *Pneumoviridae*. Su genoma está compuesto por una hebra de ARN no segmentada, de polaridad negativa, con un tamaño aproximado de 15 kb, que codifica para 11 proteínas. Entre ellas, las dos principales glicoproteínas de superficie, G y F, son especialmente relevantes para la clasificación molecular y la caracterización virológica del virus. La proteína F es la diana de los anticuerpos monoclonales y de las vacunas desarrolladas hasta el momento (9) siendo su caracterización virológica imprescindible en el escenario actual. En concreto, la caracterización genómica del sitio de unión del anticuerpo monoclonal nirsevimab, localizado en el sitio antigénico Ø de la proteína F, es un componente clave de la vigilancia genómica del virus y se ha realizado de forma sistemática a lo largo de toda la temporada 2023-2024 y 2024-2025.

El 17 de febrero de 2021, la Comisión Europea puso en marcha una de las acciones clave para reforzar la preparación y respuesta frente amenazas y emergencias transfronterizas graves, de origen natural o deliberado, mediante la creación de un programa orientado a la

detección y seguimiento de variantes del SARS-CoV-2 (10). En colaboración con el ECDC, la Comisión Europea estableció el Programa HERA-Incubator destinado a apoyar las infraestructuras nacionales de detección viral y secuenciación en los Estados miembros. En España, a través el proyecto Grant/2021/PHF/23776, se creó la Red Nacional de Laboratorios Españoles de Secuenciación Genómica de SARS-CoV-2 (RELECOV) (11). Desde 2023, esta actividad se ha consolidado mediante del programa EU4Health (EU4H), en el marco del proyecto 101113109-RELECOV 2.0, que amplía la secuenciación genómica integrándola en la vigilancia virológica de las infecciones respiratorias asociadas a SARS-CoV-2, gripe y VRS.

La disponibilidad de la plataforma RELECOV y la experiencia adquirida por la red han permitido desarrollar y aplicar metodologías propias de secuenciación del VRS. Estas metodologías han facilitado la obtención de genomas virales por parte de un grupo de los laboratorios de la red RELECOV, generando información relevante sobre las características de los virus circulantes, su evolución genética y su posible impacto sobre la eficacia del anticuerpo monoclonal nirsevimab.

Este informe recopila la información generada durante la temporada 2024-2025, y presenta los resultados de la secuenciación del VRS en España, destacando las características virológicas más relevantes detectas en los virus circulantes.

METODOLOGÍA

1. Secuencias españolas

Se analizaron 2.784 secuencias de genoma completo de VRS procedentes de muestras recogidas en España y publicadas entre las semanas epidemiológicas 40 de 2024 y 39 de 2025. De ellas, 2.404 fueron descargadas de la base internacional de secuencias genómicas GISAID (16), y 380 fueron obtenidas en el Laboratorio de Referencia e Investigación de Virus Respiratorios y Gripe del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Cabe señalar que no todas las secuencias generadas en el CNM fueron obtenidas en el marco de la red RELECOV. El total de las secuencias provenían de 15 comunidades autónomas (Figura 1).

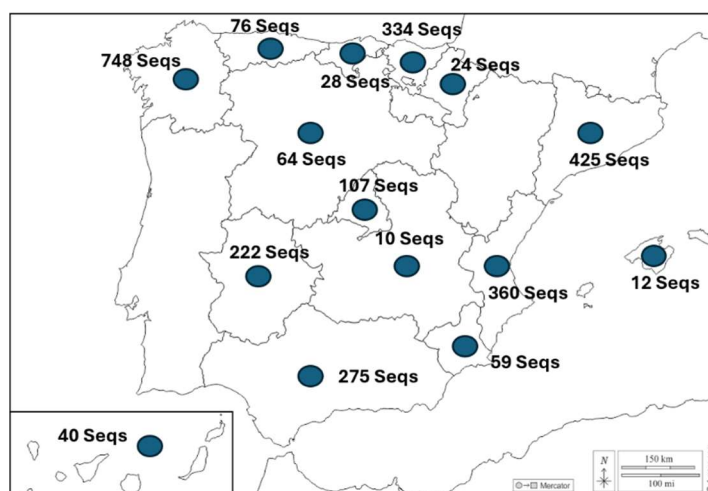


Figura 1: Distribución geográfica de las comunidades autónomas con secuencias completas de VRS publicadas en GISAID durante la temporada 2024-2025.

2. Alineamientos y árboles filogenéticos

Todas las secuencias de genoma completo incluidas en el análisis se seleccionaron en base a criterios de calidad predefinidos, consistentes en una cobertura mínima del 80% del genoma y la presencia completa de los genes que codifican los antígenos de superficie, proteínas G y F.

Para el análisis filogenético de las secuencias nacionales se emplearon 650 secuencias de VRS del subgrupo A y 687 secuencias de VRS del subgrupo B. En ambos casos, se utilizaron como referencia las secuencias de *Orthopneumovirus* subgrupo A, con código de GenBank NC_038235, y subgrupo B, con código NC_001781.

Para cada uno de los subgrupos de VRS, los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con MAFFT. Los árboles filogenéticos se generaron utilizando el software FastTreeMP (29), aplicando un modelo GTR y un análisis de bootstrap con 1.000 réplicas. Las filogenias se enraizaron con la secuencia de referencia de cada subgrupo.

3. Gráfico colorimétrico de subgrupos de B.D.E.1

Para caracterizar y diferenciar molecularmente los subgrupos de la serie B.D.E.1, se construyó un mapa colorimétrico (*heatmap*) de frecuencias y perfiles de aminoácidos consenso a partir del alineamiento de todas las proteínas codificadas por las secuencias de VRS-B incluidas en el análisis filogenético.

El análisis se realizó en tres fases. En primer lugar, se filtraron los sitios informativos, descartando las posiciones idénticas en todas las secuencias. En segundo lugar, se definió el aminoácido consenso de cada grupo en cada posición proteica bajo un umbral del 90% (representado con letras combinadas separadas por barras, ej. A/V) aquellas posiciones donde coexistían variantes sin un dominio claro. Finalmente, se generó un gráfico en el que en el eje X se muestra los subgrupos ordenados según el árbol filogenético junto con su tamaño de muestra (n), y el eje Y recoge las mutaciones agrupadas por colores según la nomenclatura estándar frente a la referencia NC_001781.1. En cada celda, el gradiente de color, de blanco a naranja/rojo, indica la frecuencia de la variante en la población de cada subgrupo, con valores comprendidos entre 0 y 1.

4. Aislamiento viral, titulación y ensayos de neutralización.

El aislamiento viral se realizó a partir de muestras respiratorias clínicas en células HEp-2. Tras la inoculación inicial, las muestras se sometieron a tres pases sucesivos en placas de 24 pocillos, monitorizando la aparición de efecto citopático y/o positividad viral. Los aislamientos con replicación detectable se expandieron posteriormente en formatos de mayor volumen para la obtención de stocks virales.

Los virus producidos se titularon mediante ensayo de formación de focos infecciosos en células HEp-2. De forma resumida, las células se infectaron con diluciones seriadas de cada stock viral y, a las 48 horas post-infección, los focos de infección se revelaron mediante inmunotinción con un cóctel de anticuerpos específicos frente a las proteínas F y G del VRS disponibles en el laboratorio.

La susceptibilidad a la neutralización se evaluó mediante ensayos de microneutralización en células HEp-2, cuantificando la reducción en el número de focos tras 48 horas de infección. La potencia neutralizante de cada anticuerpo se expresó como IC50, definida

como la concentración de anticuerpo necesaria para reducir en un 50% el número de focos de infección en comparación con el control sin anticuerpo.

RESULTADOS

1. Análisis global de las secuencias publicadas en GISAID por laboratorios españoles

Durante la temporada 2024-2025, se publicaron a nivel mundial 14.185 secuencias completas de VRS en GISAID, lo que supone un incremento de 3,5 veces respecto a la temporada previa. De estas, 2.803 corresponden a España, representando el 20% de las secuencias disponibles en la base de datos. Este dato pone de manifiesto la sólida capacidad de secuenciación genómica de VRS en nuestro país.

La distribución por subgrupo de las secuencias españolas depositadas en GISAID mostró un predominio de VRS-A, que representó el 57% de las secuencias analizadas (n=1.593) frente al 43% correspondiente a VRS-B (n=1.210) (Figura 2).

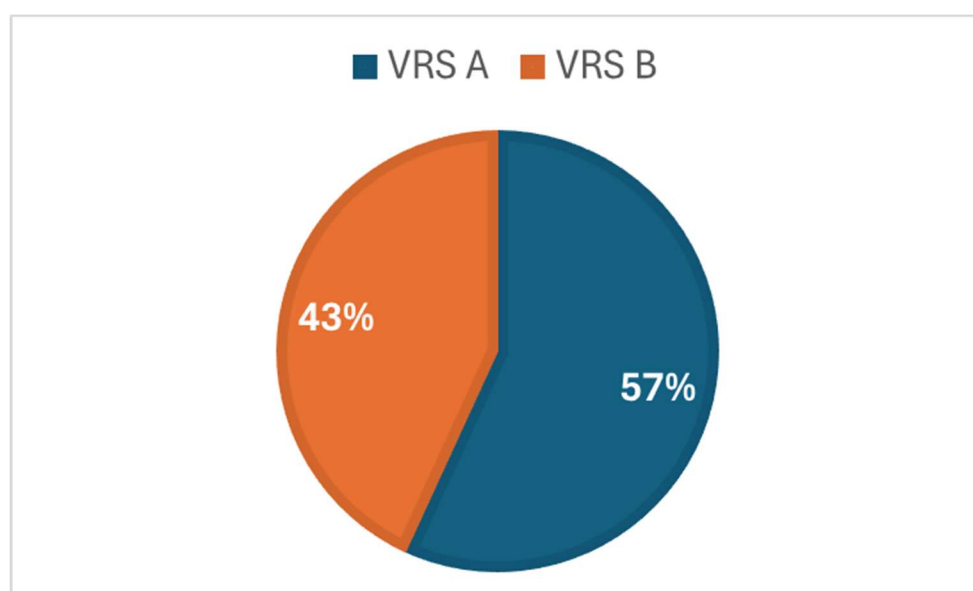


Figura 2: Porcentaje de secuencias españolas de VRS-A y VRS-B publicadas en GISAID durante la temporada 2024-2025.

Al analizar las secuencias de los distintos tipos, se observan diferencias en el número de linajes definidos a lo largo de la temporada. En VRS-A se ha detectado la circulación de 23 linajes diferentes: A.D, A.D.1, A.D.1.10, A.D.1.11, A.D.1.2, A.D.1.4, A.D.1.5, A.D.1.6, A.D.1.8, A.D.1.9, A.D.2.2.1, A.D.3, A.D.3.1, A.D.3.11, A.D.3.12, A.D.3.2, A.D.3.3, A.D.3.4, A.D.3.7, A.D.3.8, A.D.3.9, A.D.5.1 y A.D.5.2. Los linajes mayoritarios fueron A.D.3.2 (23%), A.D.1.5 (20%) y A.D.3.4 (17%), que en conjunto representan más de la mitad de las secuencias (Figura 3).

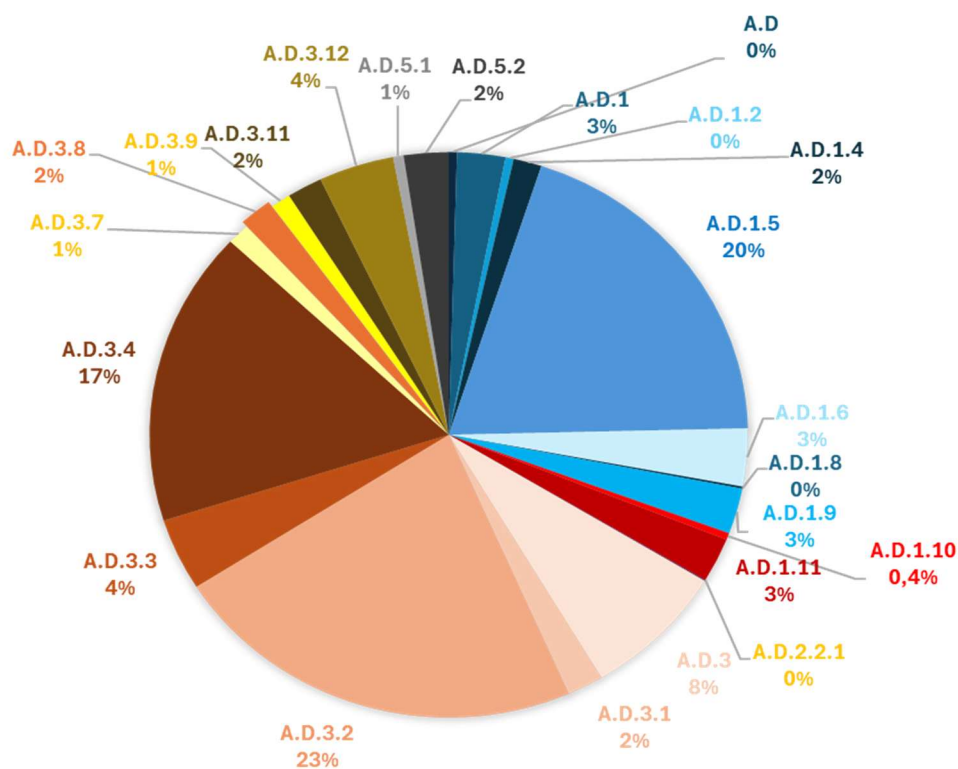


Figura 3: Porcentaje de los linajes de VRS-A en las secuencias españolas publicadas en GISAID durante la temporada 2024-2025.

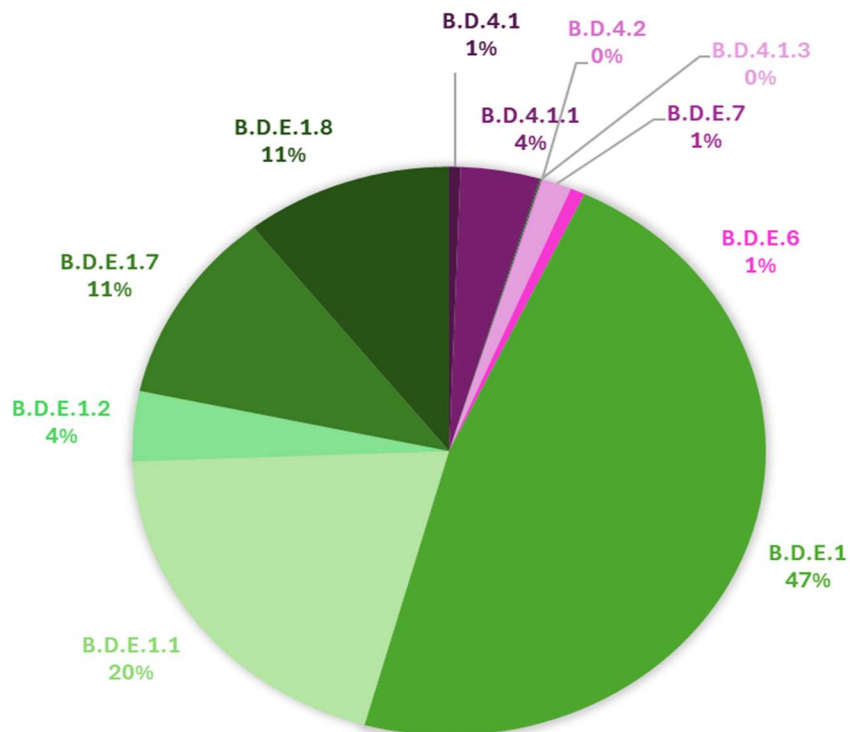


Figura 4: Porcentaje de los linajes de VRS-B en las secuencias españolas publicadas en GISAID durante la temporada 2024-2025..

En el caso de VRS-B, se han definido 11 linajes principales durante esta temporada: B.D.4.1, B.D.4.1.1, B.D.4.1.3, B.D.4.2, B.D.E.1, B.D.E.1.1, B.D.E.1.2, B.D.E.1.7, B.D.E.1.8, B.D.E.6 y B.D.E.7 (Figura 4). El linaje mayoritario fue B.D.E.1 (47%), presente en casi la mitad de las secuencias, seguido de B.D.E.1.1 (20%).

En cuanto a la distribución temporal de estos linajes identificados (Figura 5), se observa un predominio de VRS-A entre octubre de 2024 y enero de 2025. A partir del cambio de año se produjo un desplazamiento progresivo hacia VRS-B, que pasó a ser el subgrupo predominante entre febrero y junio de 2025.

Dentro de VRS-A, el linaje A.D.1.5, mayoritario en la temporada previa, fue inicialmente el más prevalente, sin embargo, su frecuencia disminuyó progresivamente a lo largo de la temporada, con un ligero repunte en enero. En el caso de VRS-B, el linaje B.D.E.1 se mantiene como el dominante durante toda la temporada, siguiendo el patrón observado en la temporada anterior. Además, al igual que en la temporada 2023-2024, se observó un aumento de diversidad de linajes a partir de marzo de 2025 en ambos subgrupos.

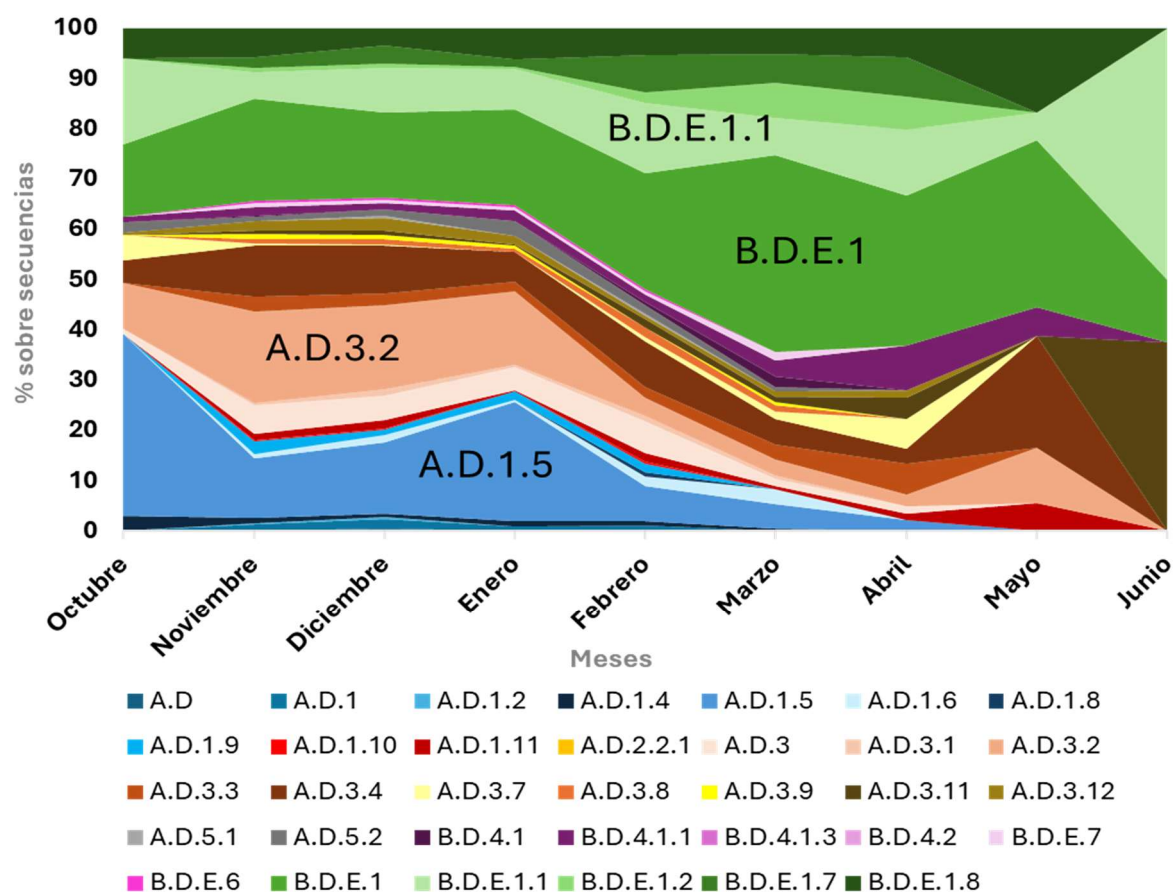


Figura 5: Porcentaje de los linajes de VRS-A y VRS-B en las secuencias españolas publicadas en GISAID durante la temporada 2024-2025.

Dado que el análisis basado exclusivamente en números absolutos de secuencias puede estar influido por diferencias en la intensidad de muestreo entre comunidades autónomas, se realizó un análisis ponderado teniendo en cuenta el número total de secuencias disponibles por comunidad autónoma en relación con cada linaje.

A nivel autonómico, se observó un predominio de VRS-A en Asturias, Islas Baleares, Islas Canarias, Cantabria, Castilla y León, Galicia, Comunidad de Madrid, Navarra y País Vasco. Por el contrario, VRS-B fue el subgrupo predominante en Andalucía, Cataluña, Comunidad Valenciana y Extremadura. En Castilla-La Mancha, los linajes A.D.5.2 y B.D.E.1 se detectaron en proporciones similares, aunque este resultado debe interpretarse con cautela debido al bajo número de secuencias disponibles.

Los linajes mayoritarios presentes en más de una comunidad autónoma fueron A.D.1.5, predominante en País Vasco y Navarra; A.D.3.4, en Cantabria, Castilla y León y Madrid; y B.D.E.1, en Andalucía y Cataluña. Esta distribución sugiere una cierta estructuración geográfica de la circulación del VRS durante la temporada 2024-2025 (Figura 6). La presencia diferencial de linajes entre territorios podría reflejar cadenas de transmisión regionales y posibles efectos de conectividad entre comunidades limítrofes o con flujos de población relevantes.

	A.D.1	A.D.1.10	A.D.1.11	A.D.1.4	A.D.1.5	A.D.1.6	A.D.1.8	A.D.1.9	A.D.3	A.D.3.1	A.D.3.11	A.D.3.12	A.D.3.2	A.D.3.3	A.D.3.4	A.D.3.7	A.D.3.8	A.D.3.9	A.D.5.1	A.D.5.2	B.D.4.1.1	B.D.E.1	B.D.E.1.1	B.D.E.1.2	B.D.E.1.7	B.D.E.1.8	B.D.E.6	B.D.E.7
AN	2	0	1	1	2	9	0	0	1	0	1	1	6	2	10	0	0	0	0	0	0	38	9	10	3	1	0	0
AS	0	0	0	4	4	0	0	0	6	0	2	45	2	0	2	0	0	0	0	0	6	4	16	0	0	6	0	2
IB	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
CN	0	0	0	0	13	0	0	0	43	0	3	0	5	0	3	0	0	0	0	0	3	33	0	0	0	0	0	0
CB	0	0	0	0	8	0	0	0	8	0	28	0	0	4	32	0	0	0	0	8	0	4	4	0	0	4	0	0
CM	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	10	10	10	0	0	0	0	20	0	20	10	0	0	0	0	0
CL	0	0	7	7	0	0	0	10	0	0	0	2	0	5	25	0	0	0	3	11	0	10	7	0	13	2	0	0
CT	0	1	4	0	4	1	0	0	2	1	1	1	6	1	1	2	6	0	0	1	1	30	7	2	6	20	0	0
VC	0	0	2	0	6	0	0	2	1	0	2	1	0	1	3	1	1	1	0	0	9	16	49	1	1	1	2	0
EX	2	1	0	1	1	1	0	6	0	0	1	0	0	1	5	0	0	0	1	1	3	19	6	1	40	11	0	2
GA	2	0	2	1	10	1	0	1	4	2	0	1	37	0	6	0	0	2	0	0	1	26	0	1	0	1	0	0
MD	2	0	0	1	1	0	0	9	1	0	0	8	1	16	41	0	0	0	1	3	1	12	0	0	2	0	0	0
MC	0	0	0	0	19	2	0	0	0	0	3	2	0	41	7	2	0	0	0	0	5	12	3	0	0	2	0	2
NA	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PV	0	0	0	0	40	0	0	0	8	0	1	5	1	1	17	2	0	0	0	1	1	14	0	0	5	2	0	2

Figura 6: Porcentaje ponderado de los linajes de VRS identificados en cada comunidad autónoma durante la temporada 2024-2025.

AN: Andalucía; AS: Asturias; ; IB: Islas Baleares; CN: Islas Canarias; CB: Cantabria; CM: Castilla la Mancha; CL: Castilla y León; CT: Cataluña; VC: Comunidad Valenciana; EX: Extremadura; GA: Galicia; MD: Comunidad de Madrid; MC: Región de Murcia; NA: Navarra y PV: País Vasco.

Al considerar los datos ponderados, la distribución de linajes en VRS-A se modificó respecto al análisis basado en números absolutos. Los linajes más abundantes fueron A.D.1.5 (22%), A.D.3.4 (17%) y A.D.1.6 (11%). Destaca especialmente el cambio observado en A.D.3.2, que pasó del 23% al 8%, mientras que A.D.1.6 aumentó del 3% al 11%, situándose como el tercer linaje más frecuente.

En el caso de A.D.3.2, esta diferencia podría explicarse por su elevada representación en Galicia, una de las comunidades autónomas con mayor número de secuencias depositadas. Este resultado pone de manifiesto la importancia de ajustar los análisis por representatividad geográfica, con el fin de evitar la sobreestimación de linajes

predominantes en territorios con mayor capacidad de secuenciación o mayor volumen de muestras analizadas (Figura 7A).

En VRS B, la ponderación no modificó sustancialmente los resultados, manteniéndose el linaje B.D.E.1 como el más abundante con una frecuencia ponderada del (47%) (Figura 7B).

La ponderación constituye una herramienta útil para minimizar sesgos derivados del análisis de secuencias sin contexto epidemiológico, así como para interpretar datos procedentes de muestras no centinela. No obstante, durante la temporada 2024-2025 se dispone también de datos de vigilancia virológica que permiten obtener una visión menos sesgada y más ajustada de los linajes realmente circulantes.

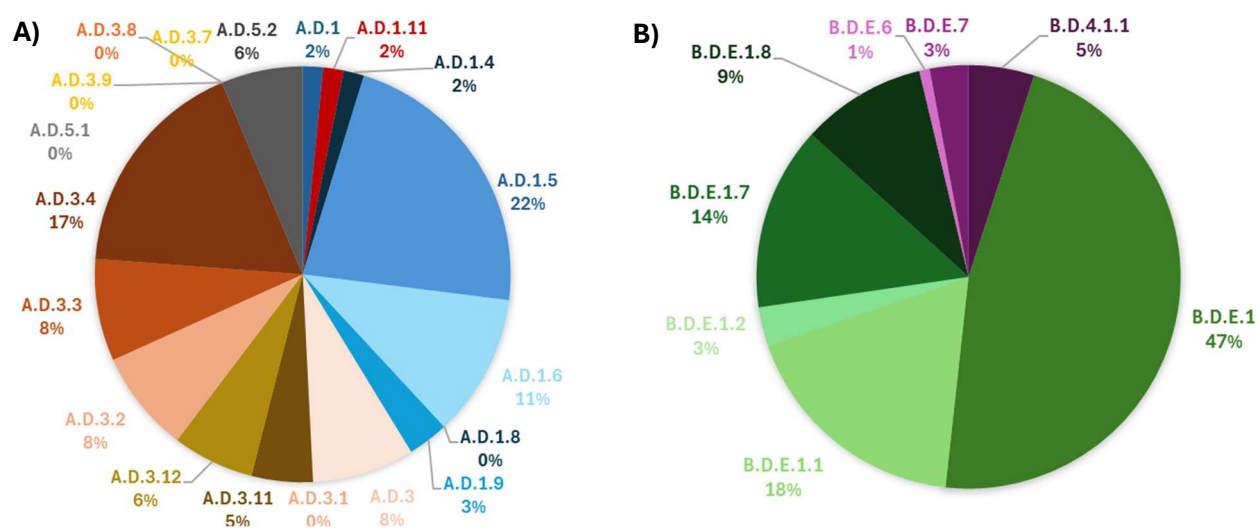


Figura 7: Porcentaje ponderado de los linajes de VRS identificados en las secuencias publicadas en GISAID por laboratorios españoles durante la temporada 2024-2025. A) Representación de los linajes de VRS-A. B) Representación de los linajes de VRS-B.

2. Integración de los datos de secuenciación en SiVIRA

Del total de secuencias de laboratorios españoles disponibles en GISAID durante la temporada 2024-2025 (n=2.803), 2.513 secuencias (90%) pudieron integrarse con la información disponible en el sistema de vigilancia centinela SiVIRA. El menor número de secuencias integradas en SiVIRA respecto al total depositado en GISAID se debió principalmente a la imposibilidad de vincular algunos casos, muestras y las secuencias de los virus mediante identificadores comunes que permitieran su cruce.

Tras la integración de datos, se identificaron 1.865 secuencias (74%) procedentes de vigilancia no centinela y 648 secuencias (26%) procedentes de vigilancia centinela. Dentro de estas últimas, 254 correspondieron a infecciones respiratorias agudas leves (IRAs) y 394 a infecciones respiratorias agudas graves (IRAG)

Se observó una ligera diferencia en la distribución de los subgrupos virales según el tipo de vigilancia. VRS-A fue más frecuente entre las secuencias procedentes de casos en la vigilancia no centinela, mientras que VRS-B mostró una mayor proporción en los casos incluidos en la vigilancia centinela (Figura 8). Esta mayor representación de VRS-B en el

sistema centinela se debió principalmente a su mayor presencia entre las muestras procedentes de la vigilancia de IRAs.

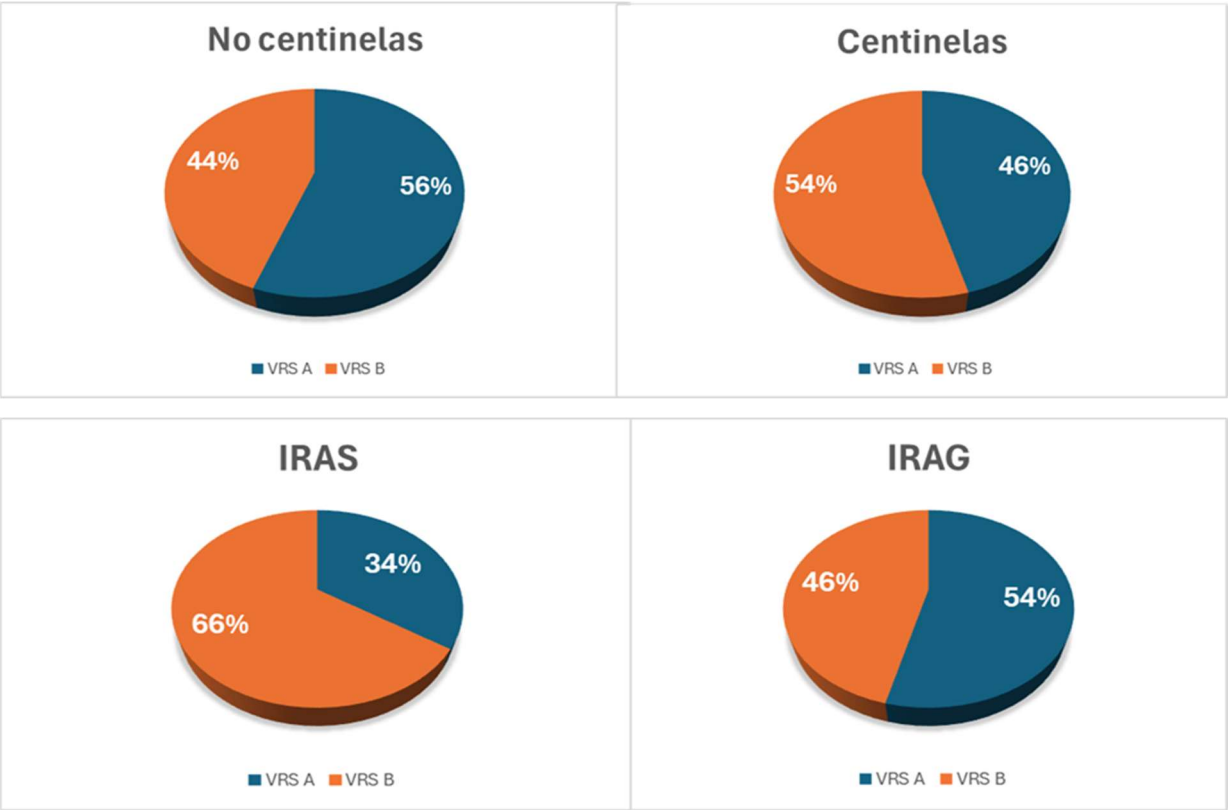


Figura 8: Porcentaje de secuencias de VRS-A y VRS-B según su procedencia de vigilancia centinela o no centinela.

En la vigilancia centinela se identificaron 26 linajes diferentes de VRS. Ocho de ellos fueron mayoritarios, A.D.1.5, A.D.3, A.D.3.2, A.D.3.4, B.D.E.1, B.D.E.1.1, B.D.E.1.8 y B.D.E.1.7, y se detectaron tanto en IRAs como en IRAG (Figura 9).

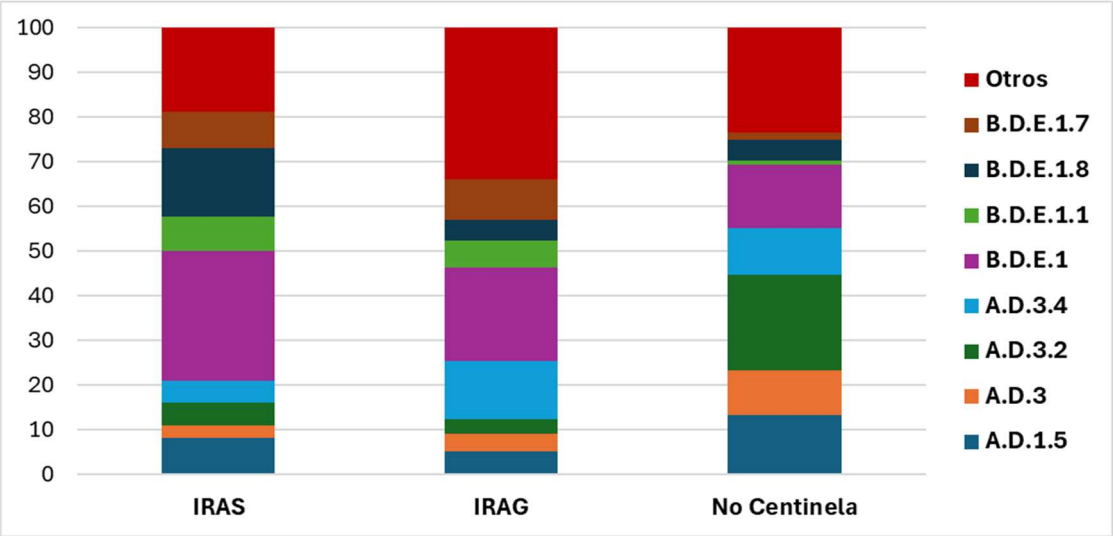


Figura 9: Porcentaje de linajes de VRS identificados en muestras procedentes de la vigilancia centinela de IRAs e IRAG.

La vigilancia en IRAG mostró una mayor diversidad de linajes minoritarios en comparación con los virus detectados en infecciones leves. Este patrón podría reflejar una mayor representación de determinados linajes minoritarios en los casos graves y hospitalizados, aunque también debe interpretarse teniendo en cuenta posibles diferencias en el muestreo y en la disponibilidad de secuencias.

Además, en IRAG se observó una mayor proporción del linaje A.D.3.4 en comparación con las muestras procedentes de IRAs, mientras que en la vigilancia no centinela predominó claramente el linaje A.D.3.2 (Figura 9).

Por su parte, la vigilancia de IRAs identificó un mayor número relativa de virus VRS-B, siendo B.D.E.1 el linaje más abundante en este grupo.

3. Contexto genómico de las secuencias publicadas por laboratorios españoles

Con el fin de contextualizar los virus circulantes en España durante la temporada 2024-2025, se generaron árboles filogenéticos para los dos subgrupos de VRS utilizando las secuencias completas con una cobertura mayor del 80% y con las regiones codificantes de las proteínas G y F completas, correspondientes al periodo comprendido entre la semana epidemiológica 40 de 2024 y la semana 39 de 2025, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Para el análisis filogenético de las secuencias nacionales de VRS-A se emplearon 650 secuencias. En el árbol filogenético se observaron los principales linajes descritos en el análisis global de las secuencias españolas (Figura 3) con excepción de los linajes A.D.1 y A.D.1.8, que no fueron incluidos debido al bajo número de secuencias disponibles y a criterios de calidad insuficientes para este análisis filogenético (Figura 10). La filogenia permitió identificar dos grandes agrupaciones: una que incluye los linajes A.D.1 y A.D.3 y sus correspondientes sublinajes, y otra que agrupa el linaje A.D.5, y sus sublinajes.

El análisis filogenético de las secuencias nacionales de VRS-B se realizó con 687 secuencias que cumplían los criterios previamente descritos. En el árbol filogenético se encontraron representados todos los linajes identificados en análisis global de las secuencias españolas de VRS-B (Figura 11).

Durante la temporada anterior, en el caso del VRS-B, se describieron tres grupos filogenéticos diferentes dentro del linaje B.D.4.1.1, lo que evidenció que la asignación de linaje no coincidía completamente con la clasificación inferida a partir del árbol filogenético (17). Esta discrepancia fue aún más evidente durante la temporada 2024-2025, en la que se identificaron 11 grupos filogenéticos distintos clasificados dentro del linaje B.D.E.1.

Con el objetivo de evidenciar las diferencias entre estos grupos, se elaboró un mapa colorimétrico que representa los cambios genéticos a lo largo de todo el genoma en comparación con las secuencias de referencia, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos (Figura 12). Esta aproximación permite identificar de forma rápida la combinación de aminoácidos que caracterizan a cada grupo y evaluar las diferencias existentes entre ellos.

Se identificó un genotipo mayoritario, representado por los subgrupos 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10 y 11, que mostró una mayor conservación en posiciones clave. Por el contrario, los subgrupos 2, 4 y 8 fueron los más divergentes. Asimismo, los grupos 2, 4, 7, 8 y 9 presentaron mutaciones únicas de grupo. Estas mutaciones fueron especialmente numerosas en el grupo 2, que acumuló nueve cambios únicos (NS2:P124L, P: A69V, G: K191R, G: R240G, G: V249L, L: T1314A, L: T1737S, L: T1757I, L: A1943V), seguido del grupo 4, con cinco mutaciones distintivas (NS1: N4S, P: T60I, F: E2G, L: S202L, L: A1694D) (Figura 12).

Las proteínas que acumularon un mayor número de mutaciones únicas entre los distintos grupos fueron G y L. Cabe destacar que ninguno de los cambios observados en la proteína F afecta al sitio de unión del anticuerpo monoclonal nirsevimab.

Algunos grupos filogenéticos muy próximos entre sí, como los grupos 5 y 6, podrían considerarse candidatos a una posible agrupación en un único linaje. Sin embargo, el valor de bootstrap asociado a esta agrupación fue de 41, lo que indica un bajo soporte estadístico y refleja la heterogeneidad existente dentro de este conjunto.

Además de la diversidad observada dentro del linaje B.D.E.1, la aparición de nuevos linajes que ocupan posiciones ancestrales respecto a los linajes actualmente circulantes, como B.D.E.6 y B.D.E.7, añade complejidad a la asignación filogenética y a la comparación de resultados entre temporadas. La naturaleza dinámica del sistema actual de clasificación, sometido a continuas revisiones y reclasificaciones periódicas, obliga a reevaluar muestras previamente analizadas y dificulta la comparación de resultados entre laboratorios y países.

En este contexto, los resultados obtenidos sugieren que la clasificación del VRS-B debería revisarse y adaptarse a sus características evolutivas específicas, incorporando criterios que reflejen mejor su dinámica filogenética. Esta adaptación podría requerir criterios diferentes a los utilizados para VRS-A, dada la distinta estructura evolutiva observada entre ambos subgrupos (Figuras 10 y 11).

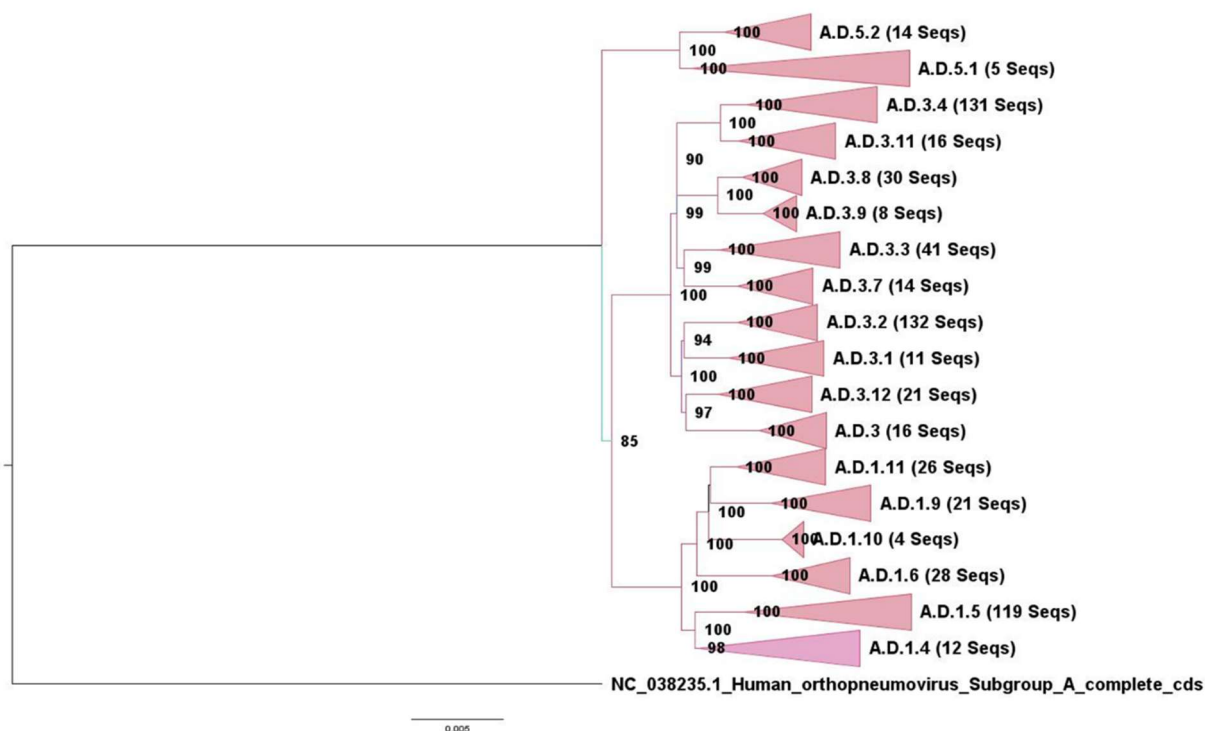


Figura 10: Árbol filogenético de secuencias completas de VRS-A disponibles en GISAID, nivel nacional, temporada 24-25 (n=650). Modelo GTR y bootstrap con 1.000 réplicas. Grupos colapsados por su anotación y coloreados por la robustez del bootstrap.

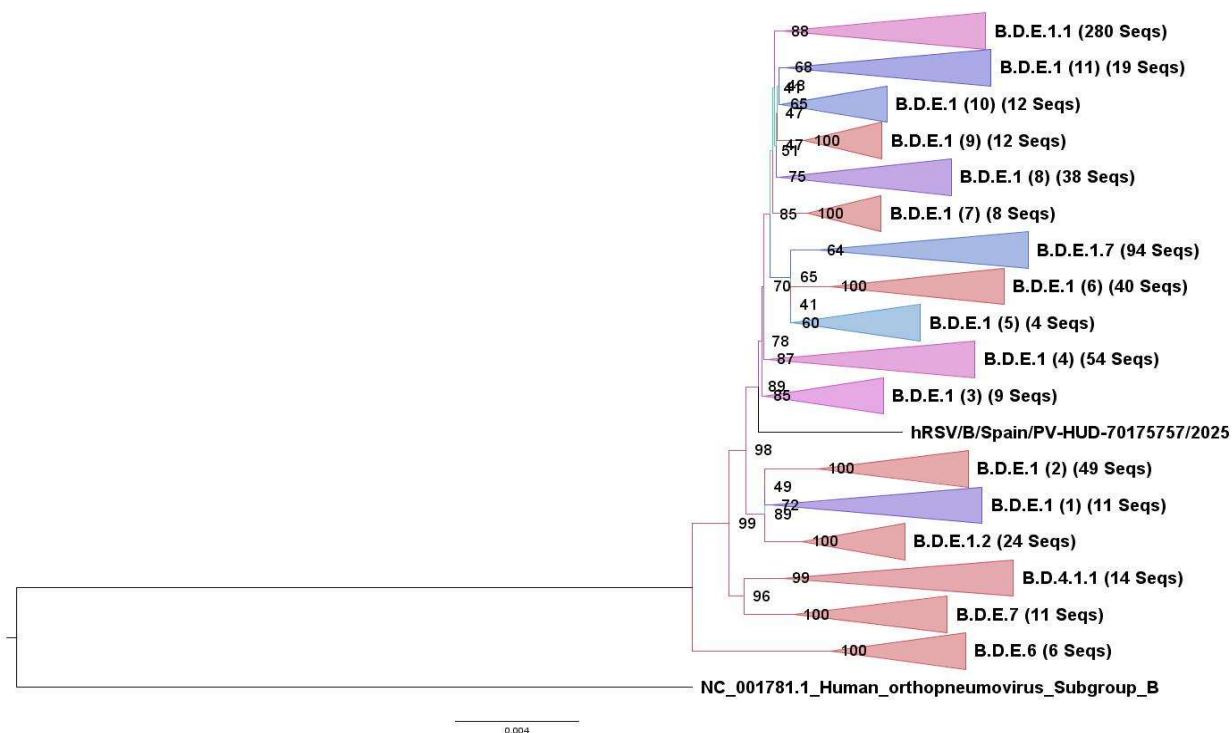


Figura 11: Árbol filogenético de secuencias completas de VRS-B disponibles en GISAID, nivel nacional, temporada 23-24 (n=610). Modelo GTR y bootstrap con 1.000 réplicas. Grupos colapsados por su anotación y coloreados por la robustez del bootstrap.

**Tabla de Descripción de Variantes:
Frecuencia de Aminoácidos Consenso (Subgrupos B.D.E.1)**

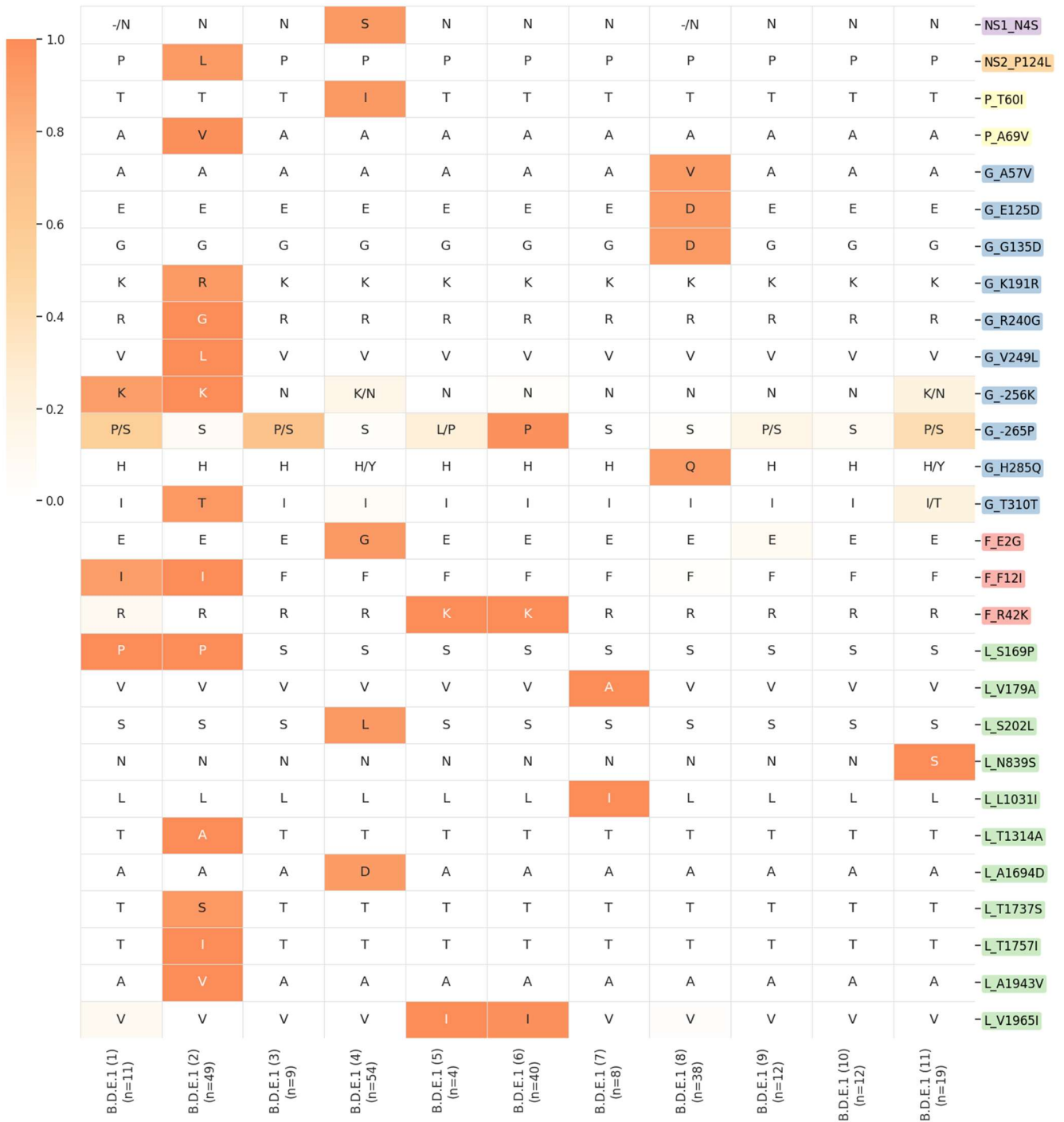


Figura 12: Mapa colorimétrico de las mutaciones presentes en los distintos grupos de B.D.E.1. La frecuencia de aparición del cambio se representa con la escala de color naranja.

4. Análisis de la proteína F de VRS en la temporada 2024-2025

4.1 Análisis genómico de la proteína F

Dado que la proteína F constituye la principal diana del anticuerpo monoclonal nirsevimab, se realizó un análisis detallado de las mutaciones detectadas, centrado en su epítipo de unión, localizado en el sitio antigénico Ø. Este sitio se encuentra en el ápice de la molécula en la región más distal respecto a la membrana viral, y representa una de las principales dianas de los anticuerpos neutralizantes frente al VRS.

Al comparar las secuencias obtenidas con las referencias previamente descritas, se observa un fenómeno común en ambos subgrupos: la presencia de un elevado número de mutaciones únicas o detectadas en muy baja frecuencia, generalmente notificadas por un único remitente. En VRS-A se identificaron 138 mutaciones en total, de las cuales 104 presentaban una frecuencia inferior al 1%. En VRS-B se detectaron 128 mutaciones, siendo también 104 de ellas inferiores al 1%. El hecho de que aproximadamente el 80% de las mutaciones descritas en ambos subgrupos sean minoritarias o únicas pone de manifiesto la importancia de verificar cuidadosamente los resultados obtenidos mediante los distintos métodos de secuenciación, especialmente en regiones de elevada relevancia biológica como la diana de unión del anticuerpo monoclonal.

Para facilitar la representación gráfica de las frecuencias de mutación en la proteína F, se excluyeron del análisis visual aquellos cambios presentes en menos del 1% de las secuencias. Como excepción, se mantuvieron las mutaciones localizadas en el sitio de unión del nirsevimab, independientemente de su frecuencia, debido a su relevancia para la vigilancia de la efectividad del anticuerpo

Centrando el análisis en VRS-A, se identificaron 25 mutaciones que cumplieran los criterios previamente descritos (Figura 13). Durante la temporada 2024-2025 se detectaron siete mutaciones en el epítipo del nirsevimab: K65R (0,4%), N67S (0,1%), D200N (0,6%), K201N (0,1%), I206T (0,1%), N208K (0,25%) y S211N (0,1%). La muy baja frecuencia de todas estas mutaciones y el hecho de que no se hayan asociado previamente con resistencias al anticuerpo indica que, por el momento, los virus circulantes mantienen una susceptibilidad teórica a nirsevimab. Además, todas las mutaciones detectadas con frecuencias elevadas, fuera del epítipo del nirsevimab, ya habían sido descritas previamente en linajes parentales de temporadas anteriores.

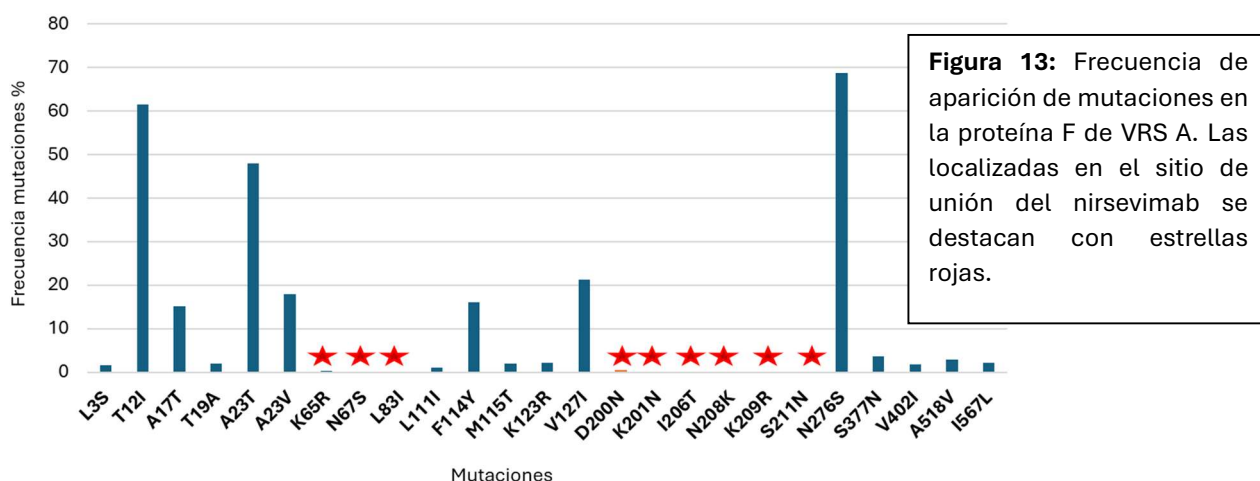


Figura 13: Frecuencia de aparición de mutaciones en la proteína F de VRS A. Las localizadas en el sitio de unión del nirsevimab se destacan con estrellas rojas.

En VRS-B se identificaron 19 mutaciones que cumplían los criterios previamente establecidos (Figura 14). De ellas, 12 se localizaban en el sitio Ø de la proteína F: I64R (0,2%), K65E (0,2%), T67N (0,6%), K68I (0,2%), Q202H (0,3%), P205S (0,2%), I206M (100%), N208D (0,2%), Q209R (100%) y S211N (100%). Las mutaciones I206M, Q209R y S211N, que se impusieron progresivamente durante la temporada previa 2023-2024 y que continúan siendo susceptibles a nirsevimab (18) , permanecieron presentes en la totalidad de las proteínas F analizadas durante esta temporada 2024-2025. El resto de las mutaciones, al igual que en VRS-A, se detectaron en proporciones muy bajas. Entre ellas, únicamente la mutación K68I ha sido asociada previamente con una reducción de la susceptibilidad a nirsevimab (19).

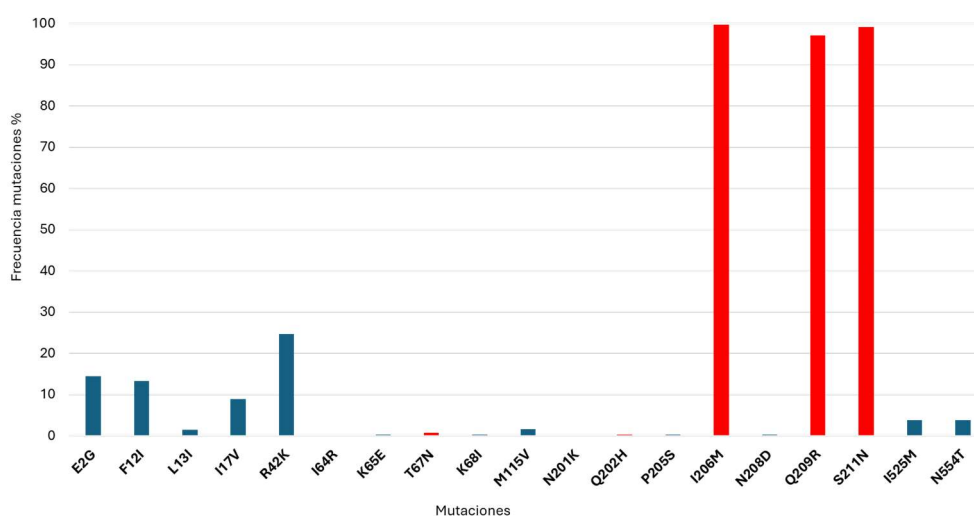


Figura 14: Frecuencia de aparición de mutaciones en proteína F de VRS B. Las situadas en el sitio de unión del nirsevimab están destacadas en rojo.

La fijación completa de determinadas mutaciones en VRS-B, sin impacto aparente sobre la susceptibilidad a nirsevimab, podría reflejar procesos de adaptación viral independientes de la presión ejercida por este anticuerpo monoclonal.

En conjunto, los resultados sugieren una estabilidad global de la diana antigénica de nirsevimab durante la temporada 2024-2025, sin evidencia de expansión de variantes asociadas a escape inmunológico frente a este anticuerpo.

4.2 Susceptibilidad de los virus circulantes a anticuerpos monoclonales

De manera paralela al estudio genómico, en las instalaciones del CNM se abordó el aislamiento y la posterior caracterización antigénica de los virus circulantes durante la temporada 2024-2025. El aislamiento viral se realizó en líneas celulares HEP-2 y Vero a partir de 103 muestras clínicas. No obstante, y en consonancia con lo observado en temporadas previas, la tasa de recuperación viral fue baja, aproximadamente del 6%, obteniéndose únicamente seis aislamientos. Esta limitación, pone de relieve la importancia de optimizar aspectos relacionados con el transporte, almacenamiento y conservación de las muestras para maximizar la viabilidad viral y facilitar su caracterización fenotípica.

A pesar del reducido número de aislamientos obtenidos, fue posible evaluar las posibles implicaciones antigénicas de algunos de los linajes circulantes mediante ensayos de

neutralización. Para ello, se analizó la susceptibilidad de los virus recuperados a anticuerpos dirigidos frente a sitios antigénicos clave de la proteína F, incluyendo nirsevimab, dirigido frente al sitio Ø, y clesrovimab, dirigido frente al sitio IV y recientemente autorizado para la prevención de la enfermedad grave por VRS en niños menores de un año.

Los resultados obtenidos mediante ensayos de microneutralización en células HEp-2 con aislados representativos de los linajes A.D.3, A.D.3.3, A.D.3.4 y A.D.5.2, incluyendo tres aislados independientes del linaje mayoritario A.D.3.4 y un aislado de cada uno de los restantes linajes, no evidenciaron cambios significativos en su susceptibilidad a la neutralización por nirsevimab o clesrovimab en comparación con la cepa de referencia A2 (Figura 15). Asimismo, los valores de IC50 obtenidos para ambos anticuerpos se mantuvieron notablemente por debajo de los observados para palivizumab frente a la misma cepa de referencia, reflejando su elevada potencia neutralizante.

Si bien la baja tasa de aislamiento viral limitó la evaluación fenotípica a un número reducido de linajes representativos, los resultados obtenidos respaldan las predicciones derivadas del análisis genómico para los linajes estudiados. En particular, la ausencia de mutaciones previamente asociadas a una reducción de la susceptibilidad a nirsevimab se correspondió con el mantenimiento de la actividad neutralizante del anticuerpo, confirmando experimentalmente la neutralización teórica inferida a partir de los datos de secuenciación.

De cara a próximas temporadas, se prevé incorporar mejoras en los protocolos de aislamiento viral con el objetivo de aumentar la recuperación de virus y ampliar los estudios de caracterización antigénica y susceptibilidad a anticuerpos de los linajes circulantes.

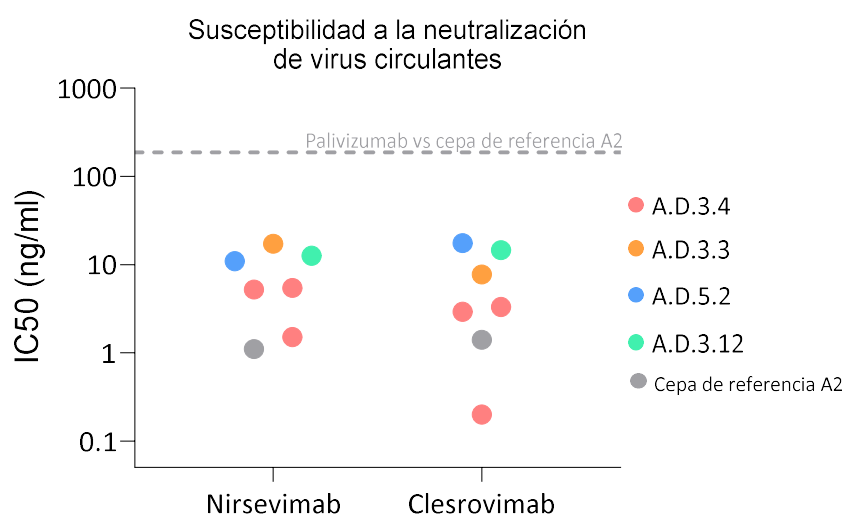


Figura 15. Susceptibilidad a la neutralización de aislados representativos de los linajes circulantes de VRS A frente a nirsevimab y clesrovimab. Los valores de IC50 se determinaron mediante ensayos de microneutralización en células HEp-2. Ninguno de los aislados analizados presentó cambios en el epítipo de unión de nirsevimab. La línea discontinua indica el valor de IC50 obtenido para palivizumab frente a la cepa de referencia A2.

5. CONCLUSIONES

1) España ha desempeñado un papel destacado en la vigilancia genómica del VRS durante la temporada 2024-2025, aportando el 20% de todas las secuencias completas disponibles en GISAID. Este elevado volumen de secuenciación ha permitido caracterizar con gran detalle la diversidad genética y la dinámica de circulación de los subgrupos VRS-A y VRS-B en nuestro país.

2) La temporada 2024-2025 se caracterizó por una elevada diversidad genética del VRS, con la circulación simultánea de numerosos linajes de VRS-A y VRS-B, así como por un cambio temporal en el subgrupo predominante. VRS-A predominó al inicio de la temporada, mientras que VRS-B aumentó progresivamente y fue mayoritario en los meses finales. Además, la distribución geográfica diferencial de determinados linajes sugiere la existencia de patrones regionales de transmisión.

3) La integración de los datos genómicos con la información epidemiológica permitió identificar diferencias en la distribución de linajes según el tipo de vigilancia y el contexto clínico. En particular, se observó una mayor diversidad genética en los casos graves de IRAG y una mayor representación relativa de VRS-B en la vigilancia centinela de IRAs. Estos resultados ponen de manifiesto el valor añadido de combinar vigilancia genómica, virológica y epidemiológica.

4) La proteína F, principal diana de nirsevimab, mostró una elevada estabilidad durante la temporada 2024-2025, sin evidencia de expansión de variantes asociadas a escape frente al anticuerpo monoclonal. Aunque se detectaron numerosas mutaciones de baja frecuencia, ninguna alcanzó niveles que sugirieran un impacto relevante sobre la susceptibilidad viral. Los análisis de neutralización realizados con aislados representativos de algunos linajes circulantes confirmaron experimentalmente las predicciones derivadas de los datos genómicos, observándose una conservación de la actividad neutralizante de nirsevimab frente a los virus analizados. En conjunto, estos resultados respaldan la continuidad de la eficacia esperada de nirsevimab frente a los virus circulantes durante la temporada estudiada.

5) Los resultados ponen de manifiesto limitaciones en la clasificación filogenética actual del VRS-B, ya que la diversidad observada dentro de algunos linajes, especialmente B.D.E.1, no queda adecuadamente reflejada por el sistema de nomenclatura vigente. Esto sugiere la necesidad de revisar y adaptar los criterios de clasificación para reflejar mejor la dinámica evolutiva específica de este subgrupo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Li Y, Wang X, Blau DM, Caballero MT, Feikin DR, Gill CJ, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 May 28;399(10340):2047–64. doi:10.1016/S0140-6736(22)00478-0 PubMed PMID: 35598608; PubMed Central PMCID: PMC7613574.
2. Savic M, Penders Y, Shi T, Branche A, Pirçon JY. Respiratory syncytial virus disease burden in adults aged 60 years and older in high-income countries: A systematic

- literature review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. 2023 Jan;17(1):e13031. doi:10.1111/irv.13031 PubMed PMID: 36369772; PubMed Central PMCID: PMC9835463.
3. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe [Internet]. 2022 [cited 2024 Sep 19]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/operational-considerations-respiratory-virus-surveillance-europe>
 4. Maintaining surveillance of influenza and monitoring SARS-CoV-2 – adapting Global Influenza surveillance and Response System (GISRS) and sentinel systems during the COVID-19 pandemic [Internet]. [cited 2024 Sep 19]. Available from: [https://www.who.int/publications/i/item/maintaining-surveillance-of-influenza-and-monitoring-sars-cov-2-adapting-global-influenza-surveillance-and-response-system-\(gisrs\)-and-sentinel-systems-during-the-covid-19-pandemic](https://www.who.int/publications/i/item/maintaining-surveillance-of-influenza-and-monitoring-sars-cov-2-adapting-global-influenza-surveillance-and-response-system-(gisrs)-and-sentinel-systems-during-the-covid-19-pandemic)
 5. Vigilancia centinela de Infección Respiratoria Aguda en Atención Primaria (IRAs) y en Hospitales (IRAG) Gripe, COVID-19 y VRS, temporada 2022-2023. España. Instituto de Salud Carlos III; 2023.
 6. Williams T, Shang M, Motta F, Zambon M, Campbell H, Nair H, et al. Progress and future directions of WHO respiratory syncytial virus surveillance – Report from the WHO meeting in November 2022. *Wkly Epidemiol Rec Relevé Épidémiologique Hebd*. 98(15):159–66.
 7. Comisión de Salud Pública del Consejo, Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Grupo de Trabajo utilización de nirsevimab frente a infección por virus respiratorio sincitial de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. Ministerio de Sanidad; 2023.
 8. Actualización de recomendaciones de utilización de nirsevimab para la temporada 2024-2025 en España [Internet]. 2024 Sep. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/comoTrabajamos/docs/NirsevimabActualizacion.pdf>
 9. Schobel SA, Stucker KM, Moore ML, Anderson LJ, Larkin EK, Shankar J, et al. Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Sci Rep*. 2016 May 23;6:26311. doi:10.1038/srep26311 PubMed PMID: 27212633; PubMed Central PMCID: PMC4876326.
 10. Commission to the European Parliament, the European Council and the Council. HERA Incubator: Anticipating together the threat of COVID-19 variants. 2021 Feb.
 11. Vázquez-Morón S, Iglesias-Caballero M, Lepe JA, Garcia F, Melón S, Marimon JM, et al. Enhancing SARS-CoV-2 Surveillance through Regular Genomic Sequencing in Spain: The RELECOV Network. *Int J Mol Sci*. 2023 May 10;24(10):8573. doi:10.3390/ijms24108573 PubMed PMID: 37239920; PubMed Central PMCID: PMC10218691.
 12. Iglesias-Caballero M, Camarero-Serrano S, Varona S, Mas V, Calvo C, García ML, et al. Genomic characterisation of respiratory syncytial virus: a novel system for whole genome sequencing and full-length G and F gene sequences. *Eurosurveillance*. 2023 Dec 7;28(49):2300637. doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.49.2300637

13. ITER. RSV repository of the Reference Laboratory for Epidemiological Surveillance of Pathogens in the Canary Islands. 2024.
14. Piñana M, González-Sánchez A, Andrés C, Vila J, Creus-Costa A, Prats-Méndez I, et al. Genomic evolution of human respiratory syncytial virus during a decade (2013–2023): bridging the path to monoclonal antibody surveillance. *J Infect.* 2024 May 1;88(5):106153. doi:10.1016/j.jinf.2024.106153
15. Davina-Nunez C, Perez-Castro S, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Montano-Barrientos J, Godoy-Diz M, Regueiro B. The Modification of the Illumina® CovidSeq™ Workflow for RSV Genomic Surveillance: The Genetic Variability of RSV during the 2022–2023 Season in Northwest Spain. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan;24(22):22. doi:10.3390/ijms242216055
16. Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance.* 2017 Mar 30;22(13):30494. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494
17. Informe: Caracterización Genómica del Virus Respiratorio Sincitial (VRS) en España. Temporada 2023-2024 [Internet]. [cited 2026 Jun 1]. Available from: <https://repisalud.isciii.es/entities/publication/6ad5f283-e452-4632-9e31-9feb5127fc96>
18. Iglesias-Caballero M, Mas V, Campoy A, Calvo C, García ML, Alcolea S, et al. Genomic Surveillance and Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Spain During the 2023-2024 Season of Nirsevimab Administration. *J Infect Dis.* 2026 Feb 18;233(2):e409–18. doi:10.1093/infdis/jiaf530 PubMed PMID: 41103028; PubMed Central PMCID: PMC13017623.
19. Fourati S, Reslan A, Bourret J, Casalegno JS, Rahou Y, Softic L, et al. Real-world emergence of nirsevimab resistance in breakthrough infections with respiratory syncytial virus-B: a multicentre observational study in France. *Lancet Microbe.* 2026 Jun 2;101353. doi:10.1016/j.lanmic.2026.101353 PubMed PMID: 42229496.