

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**RECONSTRUCCIÓN FILODINÁMICA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**POR**

**M.C.P. JULIO CÉSAR GARZA CABELLO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. C. KAME ALBERTO GALÁN HUERTA**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**JULIO, 2025**

**RECONSTRUCCIÓN FILODINÁMICA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**Aprobación de tesis**



---

**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**

**Director de Tesis**



---

**Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda**

**Co-Directora de Tesis**



---

**Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez**

**Miembro de la comisión**



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Medica (CIIViM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría del Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta

## **COLABORACIONES**

**MCP. Alí Fernando Ruiz Higareda**

**Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla**

Centro de Investigación e Innovación en Virología Medica

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

**Dra. C. Paola Bocanegra Ibarias**

**Dr. Med. Adrián Camacho Ortiz**

Servicio de Infectología

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"

Universidad Autónoma de Nuevo León

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer profundamente a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por el invaluable apoyo brindado a través de la beca que me fue otorgada. Esta beca no solo representó un sustento económico durante el desarrollo de mi tesis, sino que fue también el impulso que me permitió dedicarme de lleno a este proyecto con pasión, compromiso y tranquilidad. Sin ese respaldo, este trabajo no habría sido posible.

Agradezco con todo mi corazón al **Dr. Kame Alberto Galán Huerta**, quien ha sido mucho más que un profesor en mi vida. Desde mi año de servicio social se convirtió en mi mentor, y durante toda la maestría ha seguido guiándome con paciencia, sabiduría y fe incondicional en mis capacidades, incluso cuando yo mismo no creía en ellas. Gracias por no soltarme la mano, por los ánimos en los días oscuros, por tu guía científica y humana, y por los momentos donde fuiste más amigo que docente. Pero, sobre todo, gracias por ser mi maestro Jedi. Gracias por enseñarme que el camino del conocimiento también es el camino del corazón. Gracias a ti, hoy puedo decir que pronto dejaré de ser un Padawan y podré considerarme un Caballero Jedi... y algún día, con suerte y mucho trabajo, espero ser un Maestro Jedi como tú.

A la **Dra. Ana María Rivas Estilla**, gracias por confiar en mí desde el primer momento. Por abrirme las puertas del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, y del laboratorio CIIVIM, donde mi amor por la virología encontró hogar y donde comenzó de verdad mi formación como investigador. Gracias por ver en mí lo que yo aún no alcanzaba a ver. Por decirme, en esas pláticas que se quedan grabadas para siempre, que yo era “un médico con formación en biología molecular”... y que “eso no lo es cualquiera”. Gracias por esas palabras que se volvieron brújula, por ayudarme a crearme capaz, por sembrar en mí una identidad científica que ahora defiendo con orgullo.

A **todo el equipo de trabajo del laboratorio CIIVIM**, gracias infinitas. Gracias por su paciencia, por su apoyo constante, y por todas esas tardes llenas de risas que compartimos en los últimos años. Esas pequeñas cosas, que parecen

cotidianas, son las que uno atesora para siempre. Ustedes hicieron que la carga fuera un poquito más ligera, incluso en los días más pesados, y me recordaron una y otra vez —cuando yo dudaba— que sí pertenezco ahí, que yo también soy un científico, aunque a veces no me lo creyera. Ustedes se encargaron de que viera en ese laboratorio no solo un lugar de trabajo, sino una segunda casa... y en ustedes, a una segunda familia. Gracias por eso. No lo olvidaré nunca.

**A los profesores del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular,** gracias por tomarse el tiempo de enseñarme, aunque fuera un poco, de todo lo que saben. Cada explicación, cada consejo, cada corrección tuvo un impacto más grande del que imaginan. Sé que no fui el mejor alumno, pero sí fui uno profundamente agradecido. Todo lo que ustedes sembraron en mí lo llevo en esta tesis y también en mi camino como científico. El resultado de este trabajo no es solo mío, es de todos nosotros. Porque sin su guía, su exigencia y su ejemplo, yo no estaría hoy aquí. Sepan que cada palabra que me ayudó, cada duda que me resolvieron, cada oportunidad que me dieron está presente en este logro.

A mis **alumnos de la Preparatoria Técnica Médica,** gracias de corazón. No tienen idea del lugar que se ganaron en mi vida. En los días donde el cansancio era insoportable, donde lo único que quería era encerrarme en mi cuarto y olvidarme del mundo, ustedes me regalaron sonrisas, palabras de ánimo, cariño y apoyo incondicional. A pesar de que al inicio era un completo desconocido para ustedes, me hicieron sentir parte, y celebraron conmigo cada logro como si fuera propio. Fueron una motivación más para seguir adelante. Gracias por todo.

Y finalmente, a mi **familia y amigos,** a mis padres y hermanos que siempre estuvieron al pendiente de mi trabajo, dándome ánimos, escuchándome, acompañándome en esas noches de duda y desesperación donde sentía que ya no podía más. Ustedes me enseñaron que cuando uno comparte el peso con quienes ama, todo se vuelve más llevadero. Esto no solo es mío. Esto es para ustedes.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....               | <b>i</b>   |
| <b>LISTADO DE TABLAS</b> .....                | <b>ii</b>  |
| <b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....          | <b>iii</b> |
| <b>RESUMEN</b> .....                          | <b>v</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                         | <b>vi</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                  | <b>1</b>   |
| 1.1 Epidemiología.....                        | 1          |
| 1.2 Taxonomía.....                            | 1          |
| 1.3 Genoma.....                               | 2          |
| 1.4 Subtipos antigénicos.....                 | 2          |
| 1.5 Ciclo de replicación viral.....           | 4          |
| 1.6 Transmisión.....                          | 5          |
| 1.7 Patogénesis.....                          | 5          |
| 1.8 Signos y síntomas.....                    | 6          |
| 1.9 Diagnóstico.....                          | 7          |
| 1.10 Tratamiento.....                         | 8          |
| 1.11 Prevención.....                          | 10         |
| <b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....         | <b>12</b>  |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....                 | <b>14</b>  |
| <b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....     | <b>14</b>  |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....                     | <b>15</b>  |
| 5.1 General.....                              | 15         |
| 5.2 Específicos.....                          | 15         |
| <b>6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL GENERAL</b> ..... | <b>16</b>  |
| <b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....          | <b>17</b>  |
| 7.1 Tipo de estudio.....                      | 17         |
| 7.2 Obtención de muestras.....                | 17         |
| 7.3 Criterios.....                            | 17         |

|  |           |
|--|-----------|
| 7.3.1 Inclusión .....  | 17        |
| 7.3.2 Exclusión .....  | 18        |
| 3.3 Eliminación .....  | 18        |
| <b>8. OBJETIVO 1: FILOGENIA.....</b>                                       | <b>19</b> |
| 8.1 Extracción de ácidos nucleicos.....                                    | 19        |
| 8.2 Transcripción inversa .....  | 19        |
| 8.3 Protocolo de transcripción inversa .....                               | 20        |
| 8.4 Reacción en cadena de polimerasa.....                                  | 21        |
| 8.5 Programa del termociclador .....                                       | 22        |
| 8.6 Control de integridad y cuantificación del genoma viral.....           | 22        |
| 8.6.1 Gel de agarosa .....   | 22        |
| 8.6.2 Purificación de amplicones de ADNc.....                              | 22        |
| 8.7 Preparación de biblioteca.....   | 23        |
| 8.8 Carga de celda Flongle.....  | 25        |
| 8.9 Secuenciación.....   | 26        |
| 8.10 Procesamiento y análisis de datos de secuenciación .....              | 26        |
| 8.11 Construcción y análisis filogenético .....                            | 27        |
| <b>9. OBJETIVO 2 DISTRIBUCIÓN ESPACIO TEMPORAL.....</b>                    | <b>28</b> |
| <b>10. OBJETIVO 3: ANÁLISIS DE TRANSMISIÓN Y DINÁMICA Poblacional.....</b> | <b>33</b> |
| 10.1 Análisis de la dinámica poblacional y transmisibilidad .....          | 33        |
| <b>11. OBJETIVO 4: IDENTIFICACIÓN DE ADAPTACIONES EVOLUTIVAS .....</b>     | <b>34</b> |
| 11.1 Análisis de mutaciones y resistencia a tratamiento .....              | 34        |
| <b>12. RESULTADOS OBJETIVO 1.....</b>                                      | <b>35</b> |
| 12.1 Control de calidad.....   | 38        |
| <b>13. RESULTADOS OBJETIVO 2.....</b>                                      | <b>44</b> |
| <b>14. RESULTADOS OBJETIVO 3.....</b>                                      | <b>58</b> |
| <b>15. RESULTADOS OBJETIVO 4.....</b>                                      | <b>61</b> |
| <b>16. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>17. CONCLUSIÓN .....</b>  | <b>67</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>18. REFERENCIAS</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>19 ANEXOS</b> .....  | <b>81</b> |
| 19.1 Ejecución de alineamiento múltiple de secuencias en entorno Linux .....        | 81        |
| 19.2 Selección del modelo evolutivo mediante IQ-TREE2.....                          | 81        |
| 19.3 Inferencia filogenética utilizando IQ-TREE 2.....                              | 82        |
| 19.4 Ejecución de análisis bayesiano con BEAST utilizando aceleración por GPU ..... | 82        |

## LISTADO DE FIGURAS

| <b>FIGURA</b> | <b>TÍTULO</b>   | <b>PÁGINA</b> |
|---------------|---|---------------|
| <b>1</b>      | Estructura del Virus Sincitial Respiratorio (VSR).  | <b>2</b>      |
| <b>2</b>      | Ciclo de replicación del Virus Sincitial Respiratorio   | <b>4</b>      |
| <b>3</b>      | Diagrama experimental general   | <b>16</b>     |
| <b>4</b>      | Gel de agarosa al 1%.   | <b>37</b>     |
| <b>5</b>      | Sección de ventana de resultados de análisis realizado por la plataforma Nextclade  | <b>39</b>     |
| <b>6</b>      | Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con IQ-TREE2 a partir de secuencias del gen G del virus sincitial respiratorio (VSR). | <b>42</b>     |
| <b>7</b>      | Sección del árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen G del virus sincitial respiratorio (VSR),                                    | <b>43</b>     |
| <b>8</b>      | Sección del árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen G del virus sincitial respiratorio (VSR), generado con IQ-TREE2.             | <b>43</b>     |
| <b>9</b>      | Árbol visualizado en el programa TempEst  | <b>46</b>     |
| <b>10</b>     | Gráfico de regresión raíz a punta (root-to-tip)   | <b>46</b>     |
| <b>11</b>     | Distribución de residuos del análisis de regresión raíz a punta   | <b>47</b>     |
| <b>12</b>     | Gráfico raíz-a-punta  | <b>48</b>     |
| <b>13</b>     | Gráfico de convergencia obtenido en Tracer  | <b>50</b>     |
| <b>14</b>     | Histograma de la distribución posterior del parámetro conjunto  | <b>51</b>     |
| <b>15</b>     | Árbol filogenético obtenido mediante BEAST y visualizado en FigTree   | <b>52</b>     |
| <b>16</b>     | Árbol de máxima credibilidad de clado generado en BEAST   | <b>53</b>     |
| <b>17</b>     | Árbol de máxima credibilidad de clado generado en BEAST   | <b>54</b>     |
| <b>18</b>     | Mapa geográfico generado en Nextstrain que muestra las líneas de transmisión del virus sincitial respiratorio (VSR) en América              | <b>58</b>     |
| <b>19</b>     | Análisis filodinámico del Virus de la SARS (VSR) utilizando el modelo Bayesian SkyGrid en BEAST,  | <b>59</b>     |

## LISTADO DE TABLAS

| <b>TABLA</b> | <b>CONTENIDO</b>   | <b>PAGINA</b> |
|--------------|--|---------------|
| <b>1</b>     | Signos y síntomas de enfermedad respiratoria viral.  | <b>18</b>     |
| <b>2</b>     | Cebadores específicos para Virus Sincitial Respiratorio tipo A y tipo B  | <b>19</b>     |
| <b>3</b>     | Mezcla de mix #1 para la transcripción inversa de VSR.   | <b>20</b>     |
| <b>4</b>     | Mezcla de mix #2 para la transcripción inversa de VSR  | <b>20</b>     |
| <b>5</b>     | Tabla de mezcla de mix para PCR de Virus Sincitial Respiratorio  | <b>21</b>     |
| <b>6</b>     | Programa de PCR para Virus Sincitial Respiratorio  | <b>22</b>     |
| <b>7</b>     | Concentración obtenida por cada muestra por medio de fluorometría en el dispositivo Qiubit                                       | <b>36</b>     |
| <b>8</b>     | Datos obtenidos de la secuenciación, observando los parámetros de profundidad y cobertura por secuencia.                         | <b>38</b>     |
| <b>9</b>     | Asignación de clado por secuencia obtenida mediante la plataforma Nextclade.   | <b>39</b>     |
| <b>10</b>    | Asignación de códigos de acceso al repositorio en línea GenBank.   | <b>40</b>     |
| <b>11</b>    | Mutaciones encontradas que son compartidas entre las tres secuencias mexicanas y el gen correspondiente en el que se encuentran. | <b>62</b>     |

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|              |  |
|--------------|--|
| <b>VSR</b>   | Virus sincitial respiratorio               |
| <b>VSRh</b>  | Virus sincitial respiratorio humano        |
| <b>VSR-A</b> | Virus sincitial respiratorio tipo A        |
| <b>VSR-B</b> | Virus sincitial respiratorio tipo B        |
| <b>OVR</b>   | Otros virus respiratorios                  |
| <b>ARN</b>   | Ácido ribonucleico                         |
| <b>nm</b>    | nanómetros                                 |
| <b>M</b>     | Proteína de matriz                         |
| <b>N</b>     | nucleoproteína                             |
| <b>P</b>     | fosfoproteína                              |
| <b>L</b>     | polimerasa                                 |
| <b>NS-1</b>  | Proteína no estructural-1                  |
| <b>NS-2</b>  | Proteína no estructural-2                  |
| <b>SH</b>    | Pequeña proteína hidrofóbica               |
| <b>G</b>     | Glicoproteína                              |
| <b>F</b>     | Proteína de fusión                         |
| <b>M2</b>    | Proteína regulatoria                       |
| <b>M2-1</b>  | Proteína regulatoria-1                     |
| <b>M2-2</b>  | Proteína regulatoria-2                     |
| <b>ARNm</b>  | Ácido ribonucleico mensajero               |
| <b>ITRS</b>  | Infección del tracto respiratorio superior |
| <b>ITRI</b>  | Infección del tracto respiratorio inferior |
| <b>SatO2</b> | Saturación de oxígeno                      |
| <b>EPOC</b>  | Enfermedad Pulmonar Obstructiva<br>Crónica |
| <b>AAP</b>   | Academia Americana de Pediatría            |
| <b>DFA</b>   | Ensayo de fluorescencia directa            |
| <b>RADT</b>  | Detección rápida de antígenos              |
| <b>PCR</b>   | Reacción en cadena de la polimerasa        |
| <b>NGS</b>   | Secuenciación de próxima generación        |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>IgG1<math>\kappa</math></b>  | inmunoglobulina G, subclase 1, cadena ligera $\kappa$         |
| <b>GSK</b>                      | GlaxoSmithKline   |
| <b>COFEPRIS</b>                 | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios |
| <b>FDA</b>                      | U.S. Food and Drug Administration                             |
| <b>EMA</b>                      | European Medicines Agency                                     |
| <b>MPXV</b>                     | Virus de la viruela símica                                    |
| <b>Ct</b>                       | Threshold Cycle   |
| <b><math>\mu\text{L}</math></b> | Micro litro   |
| <b><math>\mu\text{M}</math></b> | Micro molar   |
| <b>mM</b>                       | Millimolar  |
| <b>ng</b>                       | nanogramos  |
| <b>U</b>                        | Unidades  |
| <b>ARNv</b>                     | Acido ribonucleico viral                                      |
| <b>ADNc</b>                     | Acido desoxirribonucleico complementario                      |
| <b>MAFFT</b>                    | multiple alignment using fast Fourier transform               |
| <b>GTR</b>                      | General Time Reversible                                       |
| <b>R0</b>                       | Tasa de Reproducción Básica                                   |
| <b>EB</b>                       | Buffer de elución   |
| <b>RA</b>                       | Adaptador Rápido  |
| <b>ADB</b>                      | Buffer adaptador  |
| <b>SB</b>                       | Buffer de secuenciación                                       |
| <b>FCF</b>                      | Flow cell flush   |
| <b>FCT</b>                      | Flow cell tether  |
| <b>LIB</b>                      | Perlas magnéticas de biblioteca                               |

## RESUMEN

**Título: “Reconstrucción filodinámica del Virus Sincitial Respiratorio en el Noreste de México.”**

**INTRODUCCIÓN:** El virus sincitial respiratorio humano (VSR) es una causa importante de infecciones respiratorias, especialmente en lactantes menores de seis meses y adultos mayores. A nivel global, provoca millones de casos graves y miles de muertes cada año. En México, durante la temporada invernal 2023-2024, el VSR fue el virus respiratorio más detectado, pero aún hay poca investigación sobre su epidemiología molecular en el país. Este estudio busca analizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas del VSR en México durante dicha temporada, mediante secuenciación genómica. Los hallazgos ayudarán a entender mejor su evolución y a fortalecer estrategias de vigilancia, control y diseño de vacunas. **METODOLOGÍA:** Se recolectaron muestras de hisopado faríngeo de pacientes con sospecha de enfermedad respiratoria viral atendidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante la temporada invernal 2023-2024. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética (código BI22-0004). La detección del virus sincitial respiratorio (VSR) se realizó mediante extracción de ARN y posterior PCR. La amplificación del genoma completo se llevó a cabo mediante transcripción reversa y PCR utilizando cebadores específicos. Posteriormente, se prepararon las bibliotecas y se secuenciaron mediante la tecnología Oxford Nanopore. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y anotadas utilizando las herramientas Minimap2, Medaka, bcftools, Nextclade y VAPiD. Para el análisis filogenético, se emplearon IQ-TREE2 para generar árboles de máxima verosimilitud y BEAST para construir árboles de máxima credibilidad de clado, calibrados en tiempo y espacio, integrando las secuencias mexicanas con datos disponibles en bases como NCBI Virus, alcanzando un total de 1,841 secuencias analizadas. Asimismo, se generaron gráficos Bayesian Skygrid y se estimó la tasa básica de reproducción ( $R_0$ ) para analizar el comportamiento demográfico del virus. Finalmente, mediante Nextclade, se identificó una lista de mutaciones presentes en los aislados del territorio nacional. **RESULTADOS:** El VSR en el noreste de México ha mostrado una alta diversidad genética, con múltiples introducciones transcontinentales. Un cuello de botella alrededor de 2020–2021 fue seguido por una recuperación parcial de la diversidad, la cual estuvo más influenciada por factores sociales y epidemiológicos que por cambios genéticos. Además, no se encontraron adaptaciones evolutivas, como alteraciones en la tasa de sustitución ni mutaciones asociadas a resistencia a la profilaxis y tratamientos existentes.



**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**

**Director de Tesis**

## ABSTRACT

**Title:** *Phylodynamic Reconstruction of Respiratory Syncytial Virus in Northeastern Mexico*

**INTRODUCTION:** Human respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of respiratory infections, particularly in infants under six months and the elderly. Globally, it leads to millions of severe cases and thousands of deaths each year. In Mexico, during the 2023–2024 winter season, RSV was the most frequently detected respiratory virus. However, molecular epidemiology studies on RSV in the country remain limited. This study aims to analyze the genetic diversity and phylogenetic relationships of RSV in Mexico during that season using genomic sequencing. The findings will contribute to a better understanding of RSV evolution and support surveillance, control, and vaccine development strategies.

**METHODOLOGY:** Pharyngeal swab samples were collected from patients with suspected viral respiratory disease at the “Dr. José Eleuterio González” University Hospital during the 2023–2024 winter season. The study was approved by the Ethics Committee (code BI22-0004). RSV detection was performed through RNA extraction followed by PCR. Whole genome amplification was conducted using reverse transcription and PCR with specific primers. Subsequently, libraries were prepared and sequenced using Oxford Nanopore technology. The obtained sequences were assembled and annotated using tools such as Minimap2, Medaka, bcftools, Nextclade, and VAPiD. For phylogenetic analysis, IQ-TREE2 was used to construct maximum likelihood trees, and BEAST was employed to generate time- and space-calibrated maximum clade credibility trees. The analysis incorporated Mexican sequences with those from public databases such as NCBI Virus, totaling 1,841 sequences. Bayesian Skygrid plots were generated, and the basic reproduction number ( $R_0$ ) was estimated to assess the virus's demographic behavior. Finally, a list of mutations found in the national isolates was identified using Nextclade.

**RESULTS:** RSV in northeastern Mexico displayed high genetic diversity, with multiple transcontinental introductions. A genetic bottleneck around 2020–2021 was followed by a partial recovery of diversity, driven more by social and epidemiological factors than by genetic changes. No evidence of evolutionary adaptations was found, such as alterations in substitution rates or mutations linked to resistance against prophylaxis or current treatments.



**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**

**Director de Tesis**

## INTRODUCCIÓN

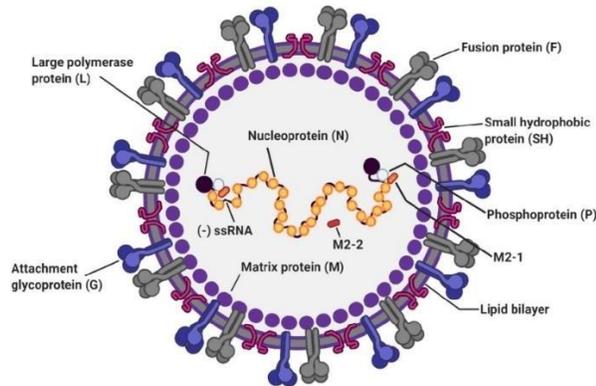
### 1.1 Epidemiología

Cada año, se estima que en todo el mundo el virus sincitial respiratorio (VSR) causa 33 millones de casos y entre 66,000 y 199,000 muertes de niños menores de cinco años.<sup>1</sup> Durante la temporada invernal 2023-2024, hasta la semana epidemiológica 19 de 2024, en México se confirmaron 6,016 casos positivos de Otros Virus Respiratorios (ORV), de los cuales el 43% se atribuye al virus sincitial respiratorio.

La prevalencia se observa notablemente en los grupos etarios de 1 a 4 años, predominantemente en Ciudad de México, Estado de México, Aguascalientes, Nuevo León y San Luis Potosí.<sup>2</sup>

### 1.2 Taxonomía

El VSR es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo.<sup>3</sup> El nombre científico de esta especie viral es *orthopneumovirus* humano, que es sinónimo del virus sincitial respiratorio humano (VSRh), comúnmente abreviado como VSR. Pertenece al género *Orthopneumovirus*, familia *Pneumoviridae*, orden *Mononegavirales*. Su nombre proviene del hecho de que las proteínas F en la superficie del virus hacen que las membranas de las células vecinas se fusionen, creando grandes sincitios multinucleados.<sup>4</sup>



**Figura 1. Estructura del Virus Sincitial Respiratorio (VSR).** Tomada de Jung HI, *et al.* Viruses. (2020)

### 1.3 Genoma

El genoma es lineal y tiene aproximadamente 15,000 nucleótidos de longitud. Estructuralmente, el VSR es un virus esférico con envoltura que mide aproximadamente 150 nm de diámetro.<sup>5</sup> Su genoma de ARN está encerrado dentro de la partícula viral y codifica proteínas estructurales internas cruciales las cuales incluyen; proteína de matriz (M), nucleoproteína (N), proteínas necesarias para un complejo de polimerasa funcional como fosfoproteína (P) y polimerasa (L), proteínas no estructurales implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata (NS-1 y NS-2), glicoproteínas transmembrana expuestas externamente como la pequeña proteína hidrofóbica (SH), glicoproteína (G), proteína de fusión (F) y proteína regulatoria (M2) dividida en proteínas de antiterminación M2-1 y M2-2, involucradas en la regulación de la transcripción/replicación.<sup>6</sup>

### 1.4 Subtipos antigénicos

El virus sincitial respiratorio se clasifica en dos subtipos antigénicos principales: VSR-A y VSR-B. Esta clasificación se basa en diferencias antigénicas detectadas mediante anticuerpos monoclonales dirigidos principalmente contra la proteína de fusión (F)<sup>7</sup>, aunque la mayor variabilidad genética y antigénica se localiza en la glicoproteína de adhesión G, lo que permite diferenciar no solo los subtipos, sino también múltiples genotipos y clados dentro de cada uno.<sup>8</sup>

Ambos subtipos pueden circular simultáneamente durante una misma temporada epidémica, aunque típicamente el subtipo A se detecta con mayor frecuencia que el B. No obstante, la predominancia relativa puede variar según el año y la región.<sup>8</sup>

Dentro de cada subtipo, el VSR presenta una notable diversidad genética, representada por distintos genotipos, definidos con base en variaciones en la secuencia del gen G. A su vez, estos genotipos pueden dividirse en clados, grupos de secuencias filogenéticamente relacionados que comparten mutaciones específicas y características evolutivas comunes.<sup>9</sup>

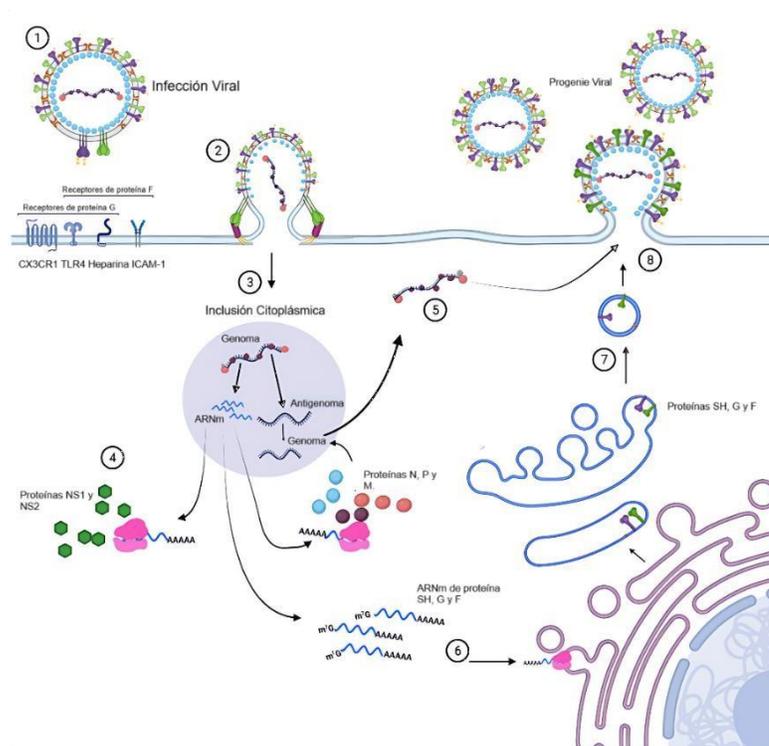
En el subtipo VSR-A, el genotipo ON1, identificado por una inserción de 72 nucleótidos en el gen G, ha sido el más prevalente a nivel mundial durante la última década. Este genotipo ha evolucionado y se ha diversificado en varios clados, entre los que destacan ON1.1, ON1.2, ON1.3, ON1.4 y ON1.5, cada uno definido por sustituciones de aminoácidos específicas en la región hipervariable de la proteína G. Estos clados han mostrado una dinámica evolutiva activa y su distribución geográfica y temporal varía, lo que sugiere una adaptación del virus a diferentes presiones inmunológicas.<sup>9</sup>

En el subtipo VSR-B, el genotipo BA (que presenta una duplicación de 60 nucleótidos en el gen G) es el dominante desde finales de los años noventa. Este también ha dado origen a múltiples clados, entre los cuales se han descrito variantes como BA-CC1a, BA-CC1b y BA-CC2, que muestran una circulación persistente a nivel global. Estas variantes se caracterizan por mutaciones acumulativas que podrían estar asociadas a ventajas en la evasión inmune o a una mayor transmisibilidad.<sup>10</sup>

De acuerdo con estudios recientes, tras la pandemia de COVID-19 y las medidas sanitarias implementadas, los únicos genotipos/clados que circulan de forma significativa en la actualidad son ON1 (VSR-A) y BA-CC (VSR-B).<sup>10</sup> Esta aparente restricción genética podría reflejar un efecto de cuello de botella poblacional del virus, así como la presión selectiva ejercida por la inmunidad de grupo y los cambios en el comportamiento poblacional.<sup>10</sup>

## 1.5 Ciclo de replicación viral

Después de la fusión de las membranas del virus y de la célula huésped, la nucleocápside viral, que contiene el genoma viral, y la polimerasa viral asociada se entregan al citoplasma de la célula huésped. La transcripción y la traducción ocurren dentro del citoplasma. La ARN polimerasa dependiente de ARN transcribe el genoma en 10 segmentos de ARN mensajero (ARNm), que son traducidos en proteínas estructurales por la maquinaria de la célula huésped. Durante la replicación del genoma viral de sentido negativo, la ARN polimerasa dependiente de ARN sintetiza un complemento de sentido positivo llamado anti genoma. Esta cadena complementaria se utiliza como plantilla para construir ARN genómico de sentido negativo, que se empaqueta en nucleocápsides y se transporta a la membrana plasmática para el ensamblaje y la gemación de partículas.<sup>9</sup>



**Figura 2. Ciclo de replicación del Virus Sincitial Respiratorio.** Córdova *et. al.* Virus Genes (2022)

## **1.6 Transmisión**

El VSR es altamente contagioso y puede causar brotes tanto por transmisión comunitaria como hospitalaria. Se estima que el R0 del VSR es de 3.<sup>10</sup> El VSR puede propagarse cuando una persona infectada tose o estornuda, liberando gotitas contaminadas en el aire. La transmisión generalmente ocurre cuando estas gotitas entran en contacto con los ojos, la nariz o la boca de otra persona. Como ocurre con todos los patógenos respiratorios que se presume se transmiten a través de gotitas respiratorias, es muy probable que se transporte por los aerosoles generados durante la respiración y el habla.<sup>11</sup> El VSR también puede sobrevivir hasta 25 minutos en la piel contaminada, es decir, las manos, y varias horas en otras superficies como en mesas y perillas de puertas. Tiene un período de incubación de 2 a 8 días. Una vez infectadas, las personas suelen ser contagiosas durante 3 a 8 días. Sin embargo, en los bebés y en las personas con sistemas inmunitarios debilitados, el virus puede continuar propagándose hasta por 4 semanas incluso después de que ya no presenten síntomas.<sup>12</sup>

## **1.7 Patogénesis**

Después de la transmisión a través de la nariz o los ojos, el VSR infecta las células epiteliales cilíndricas ciliadas de las vías respiratorias superiores e inferiores.<sup>4</sup> El VSR continúa replicándose dentro de estas células bronquiales durante unos 8 días.

Después de los primeros días, las células infectadas por el VSR se vuelven más redondeadas y, finalmente, se desprenden hacia los bronquiolos más pequeños de las vías respiratorias inferiores. Se cree que este mecanismo de desprendimiento también es responsable de la propagación del virus desde las vías respiratorias superiores a las inferiores. La infección causa inflamación generalizada en los pulmones, incluyendo la migración e infiltración de células inflamatorias como monocitos y células T, necrosis de la pared celular epitelial, edema y aumento de la producción de moco. La inflamación y el daño celular

tienden a ser irregulares en lugar de difusos. En conjunto, las células epiteliales desprendidas, los tapones de moco y las células inmunitarias acumuladas causan la obstrucción de las vías respiratorias inferiores.<sup>3, 4</sup>

## **1.8 Signos y síntomas**

La infección por VSR puede presentarse con una amplia variedad de signos y síntomas que van desde infecciones leves del tracto respiratorio superior (ITRS) hasta infecciones graves y potencialmente mortales del tracto respiratorio inferior (ITRI) que requieren hospitalización y ventilación mecánica. Aunque el VSR puede causar infecciones del tracto respiratorio en personas de todas las edades y es una de las infecciones infantiles más comunes, su presentación a menudo varía según el grupo de edad y el estado inmunológico.<sup>13</sup>

Las infecciones por VSR en la infancia son bastante autolimitadas, con signos y síntomas típicos del tracto respiratorio superior, como congestión nasal, rinorrea, tos y fiebre leve. En la exploración clínica, se puede observar rinitis y faringitis, así como inyección conjuntival. Aproximadamente entre el 15% y el 50% de los niños desarrollarán infecciones más graves del tracto respiratorio inferior, como bronquiolitis, neumonía viral o laringotraqueobronquitis.<sup>14</sup>

La bronquiolitis es una infección común del tracto respiratorio inferior caracterizada por la inflamación y obstrucción de las pequeñas vías respiratorias en los pulmones. Aunque varios virus pueden causar bronquiolitis, el VSR es responsable de aproximadamente el 70% de los casos. Usualmente, se presenta con 2 a 4 días de rinorrea y congestión, seguidos de empeoramiento de la tos, estertores, taquipnea y sibilancias. Puede haber fiebre, pero la fiebre alta (>38.5°C) es poco común.

A menudo se pueden escuchar estertores y sibilancias en la auscultación, y los niveles de saturación de oxígeno pueden estar disminuidos (<95% SatO<sub>2</sub>).<sup>15</sup> La reinfección con VSR sigue siendo común a lo largo de la vida. La reinfección en la edad adulta a menudo produce solo síntomas leves a moderados que no se distinguen del resfriado común o la infección sinusal. La infección también

puede ser asintomática. Si hay síntomas, generalmente se limitan al tracto respiratorio superior: rinorrea, odinofagia, fiebre y malestar general. En la gran mayoría de los casos, la congestión nasal precede al desarrollo de la tos. A diferencia de otras infecciones del tracto respiratorio superior, el VSR también es más probable que cause sibilancias de aparición nueva en adultos. Aproximadamente el 25% de los adultos infectados progresarán a una infección significativa del tracto respiratorio inferior, como bronquitis o traqueobronquitis.<sup>13</sup>

El VSR afecta a muchas poblaciones de manera diferente. La población con mayor riesgo de complicaciones por VSR son los pacientes pediátricos, los adultos mayores y aquellos con condiciones médicas subyacentes o inmunocomprometidos. Entre 60,000 y 160,000 adultos mayores en los Estados Unidos son hospitalizados anualmente con VSR.<sup>16</sup> Entre 6,000 y 10,000 adultos mayores mueren a causa de la infección por VSR cada año. Además, el VSR puede llevar al empeoramiento de condiciones graves como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una enfermedad pulmonar común que causa restricción del flujo de aire y problemas respiratorios, e incluso la insuficiencia cardíaca congestiva, cuando el corazón no puede bombear suficiente sangre y oxígeno a través del cuerpo. La atención médica rápida y adecuada es importante para los adultos mayores, ya que esperar o recibir un diagnóstico erróneo puede estar asociado con un mayor riesgo de complicaciones.<sup>16</sup>

## **1.9 Diagnóstico**

diagnóstico de la infección por virus sincitial respiratorio puede realizarse mediante diversas técnicas, entre ellas pruebas de detección de antígenos, cultivo viral y pruebas moleculares. Aunque la Academia Americana de Pediatría (AAP) no recomienda el uso rutinario de pruebas de laboratorio para confirmar bronquiolitis en niños previamente sanos, su empleo puede estar justificado en pacientes de alto riesgo, o cuando el resultado influirá en decisiones clínicas o de control epidemiológico.<sup>4</sup>

En el contexto clínico, las pruebas rápidas de detección de antígenos (RADT) y el ensayo de fluorescencia directa (DFA) se utilizan ampliamente debido a su bajo costo y rapidez, aunque presentan limitaciones importantes, especialmente fuera de la población pediátrica o durante periodos de baja circulación viral.<sup>4,18</sup>

Los ensayos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrecen una mayor sensibilidad, especialmente útil en adultos o pacientes con menor carga viral.<sup>4</sup> Sin embargo, estas técnicas, aunque eficaces para la detección del virus, no proporcionan información detallada sobre la identidad genética, los genotipos o los clados circulantes, datos esenciales para la vigilancia epidemiológica y la detección de variantes emergentes.

Es en este contexto donde la secuenciación de próxima generación (NGS) adquiere un papel fundamental. Esta tecnología permite no solo detectar la presencia del virus, sino también analizar su variabilidad genética, reconstruir relaciones filogenéticas y rastrear la evolución viral en tiempo y espacio.<sup>21</sup> En particular, la secuenciación de tercera generación, como la basada en tecnología de nanoporos, permite obtener secuencias largas de forma rápida y portátil, siendo una herramienta poderosa en entornos con infraestructura limitada.<sup>21</sup>

Para esta tesis, la NGS se utilizó con el objetivo de caracterizar genéticamente los aislados de VSR recolectados durante la temporada invernal 2023–2024 en el área metropolitana de Monterrey, permitiendo la identificación de genotipos y clados circulantes, así como la detección de mutaciones potencialmente asociadas con resistencia a terapias o evasión inmune.

En conjunto, esta metodología supera las limitaciones de las técnicas diagnósticas tradicionales y proporciona información crítica para la vigilancia molecular, el diseño de vacunas y la predicción de cambios epidemiológicos.<sup>21,22</sup>

## **1.10 Tratamiento**

Actualmente, el tratamiento de la infección por VSR se basa principalmente en medidas de soporte clínico, como el suministro de oxígeno,

hidratación intravenosa y asistencia respiratoria en casos graves. La mayoría de los medicamentos antivirales y antiinflamatorios utilizados en otras infecciones respiratorias no han mostrado beneficios significativos en la bronquiolitis por VSR, por lo que su uso no es recomendado de forma rutinaria.<sup>23,30</sup>

Sin embargo, uno de los principales avances terapéuticos y preventivos frente al VSR ha sido el desarrollo de anticuerpos monoclonales, como palivizumab y nirsevimab, dirigidos contra la proteína F, una glicoproteína de fusión esencial para la entrada del virus a la célula hospedera.<sup>25,28</sup>

Estos anticuerpos son diseñados para unirse a epítomos específicos en la proteína F, bloqueando la replicación viral. El más reciente, nirsevimab, ha demostrado eficacia superior a palivizumab, con una sola dosis estacional y un perfil de seguridad favorable.<sup>27</sup> Clesrovimab, actualmente en ensayos clínicos avanzados, también ha mostrado resultados prometedores.<sup>29</sup>

No obstante, la eficacia de estas terapias puede verse comprometida por mutaciones emergentes en las regiones objetivo de la proteína F, especialmente en el contexto de una presión selectiva ejercida por la inmunidad colectiva y el uso extendido de terapias basadas en anticuerpos. En este sentido, la caracterización genética del VSR, incluyendo el análisis de clados y variantes circulantes mediante técnicas como la secuenciación de tercera generación, se vuelve fundamental.

Estudios recientes han identificado mutaciones asociadas a escape inmunológico dentro de ciertos clados del genotipo ON1 (VSR-A), que podrían reducir la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales, afectando su eficacia clínica. Del mismo modo, variantes del genotipo BA (VSR-B) han mostrado cambios en la proteína F que justifican un monitoreo genético continuo.<sup>30</sup>

Por tanto, en el contexto de esta tesis, el análisis filogenético y genómico del VSR no solo contribuye a comprender la diversidad viral, sino que también permite anticipar la posible aparición de variantes resistentes a anticuerpos

monoclonales, lo que tiene implicaciones directas para las estrategias de inmunización y tratamiento a futuro.

### **1.11 Prevención**

El desarrollo de vacunas contra el virus sincitial respiratorio (VSR) representa un avance importante en la prevención de infecciones respiratorias graves, particularmente en adultos mayores, lactantes y personas inmunocomprometidas. Las vacunas recientemente aprobadas, como Arexvy (GSK) y Abrysvo (Pfizer), están basadas en versiones estabilizadas de la proteína F en su conformación de prefusión, común a los subtipos A y B del virus.<sup>31,36</sup> Estas formulaciones han demostrado eficacia significativa en la reducción de hospitalizaciones y enfermedad respiratoria grave, tanto en adultos como en lactantes mediante inmunización materna.<sup>37,40</sup>

En 2024, Arexvy fue autorizada en México para su uso en adultos mayores de 60 años por la COFEPRIS, mientras que otras vacunas, como mRESVIA (Moderna), basada en ARNm, también han sido aprobadas en Estados Unidos y Europa.<sup>39,42</sup>

Sin embargo, la presión inmunológica ejercida por estas nuevas vacunas podría favorecer la selección de variantes del VSR con mutaciones en la proteína F, especialmente en regiones inmunodominantes del antígeno. Por esta razón, la caracterización genética de las cepas circulantes, como la que se realiza mediante secuenciación de tercera generación, se vuelve crítica para monitorear posibles eventos de escape inmunológico.

Diversos estudios han reportado que algunos clados del genotipo ON1 (VSR-A) y variantes emergentes del genotipo BA (VSR-B) pueden presentar mutaciones puntuales en sitios clave de la proteína F, lo que podría disminuir la eficacia de los anticuerpos neutralizantes inducidos por vacunas. La vigilancia filogenética continua permite identificar tempranamente estas variantes, evaluar su expansión poblacional, y determinar su impacto potencial en la eficacia vacunal.<sup>36</sup>

Así, en el marco de esta tesis, la secuenciación y análisis filogenético de cepas de VSR circulantes en Monterrey durante la temporada 2023–2024 tiene como finalidad anticipar cambios genéticos que puedan comprometer la efectividad de las vacunas recientemente introducidas o en evaluación, aportando evidencia para la vigilancia genómica y la toma de decisiones en salud pública.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Los trabajos previos realizados por el equipo de investigación, como el análisis de infecciones postvacunales de SARS-CoV-2 y la caracterización genómica del virus de la viruela símica (MPXV), han demostrado su capacidad para aplicar metodologías de secuenciación genómica y análisis filogenético con el fin de identificar variantes virales, evaluar la eficacia de intervenciones vacunales y rastrear rutas de transmisión. Esta experiencia es directamente transferible al estudio del VSR, particularmente en un contexto donde se han aprobado recientemente nuevas vacunas para adultos mayores y embarazadas, y donde la vigilancia genómica es esencial para comprender su diversidad genética, evolución y asociación con patrones clínicos y epidemiológicos.

En el año 2022, Galán-Huerta *et. al.* Analizaron las infecciones postvacunales de SARS-CoV-2 en Monterrey, México, durante 2021, con el objetivo de identificar variantes del virus asociadas con estas infecciones y su impacto en la efectividad de las vacunas utilizadas localmente. Se compararon pacientes vacunados con esquemas parciales o completos de las vacunas CanSino, Sinovac, Pfizer/BioNTech y AstraZeneca, frente a pacientes no vacunados. Las infecciones postvacunales fueron más frecuentes en personas vacunadas con CanSino, lo que se atribuyó a su alta prevalencia en la población estudiada, y en general, estos pacientes presentaron síntomas leves que no requirieron hospitalización. Mediante secuenciación genómica, se identificó que la variante Delta B.1.617.2 predominó en pacientes ambulatorios, mientras que la variante AY.4 fue más común en pacientes hospitalizados. Además, se detectó la variante Mu B.1.621 en un pequeño porcentaje de pacientes vacunados. Los resultados sugieren que estas variantes pueden comprometer la eficacia de las vacunas disponibles, subrayando la necesidad de monitorear las variantes del virus para ajustar estrategias de vacunación y control en la región.

En el año 2023, Galán-Huerta *et. al.* Realizaron un estudio que se enfocó en el análisis genómico del virus de la viruela símica (MPXV) debido a un brote

multicéntrico de casos de MPXV en personas sin vínculo epidemiológico con regiones endémicas del virus. Se secuenció el genoma completo de un aislado de MPXV obtenido de un paciente en el norte de México. El análisis filogenético mostró que este virus estaba estrechamente relacionado con aislados provenientes de Alemania. Estos hallazgos destacan la propagación internacional del virus y subrayan la importancia de la vigilancia genómica para comprender las dinámicas de transmisión de MPXV fuera de sus áreas endémicas tradicionales.

La aplicación de estudios como los realizados con SARS-CoV-2 y el virus de la viruela símica (MPXV) destaca la importancia de la vigilancia genómica y el análisis filogenético en la epidemiología molecular de enfermedades infecciosas, como lo es el VSR que en los últimos años ha cobrado mayor importancia debido a que se ha observado que este tiene una morbimortalidad importante en adultos mayores e inmunocomprometidos y no solo en pacientes pediátricos como se pensaba anteriormente, así como la importancia de la vigilancia postvacunales ya que en este año se han aprobado tres nuevas vacunas para tratar las infecciones por VSR en adultos mayores y mujeres embarazadas.

Este enfoque metodológico permite identificar variantes del virus asociadas con mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad o resistencia a vacunas, como se observó en las infecciones postvacunales de SARS-CoV-2. Además, el rastreo de linajes genéticos, como en el caso de MPXV, facilita el entendimiento de las rutas de transmisión internacionales y la emergencia de brotes en regiones no endémicas. Aplicar estas estrategias al estudio del VSR proporcionará información clave sobre la diversidad genética del virus, su evolución en respuesta a intervenciones vacunales, y su relación con patrones clínicos y epidemiológicos, lo cual es esencial para optimizar medidas de control y prevenir la propagación del virus.

### 3

#### **JUSTIFICACIÓN**

El VSR afecta gravemente a niños, personas inmunocomprometidas y adultos mayores. Con el rápido envejecimiento de la población demográfica en México, se prevé que el impacto del VSR en los adultos mayores aumente. Sin embargo, la falta de estudios suficientes sobre la epidemiología molecular del VSR en el país limita la comprensión del virus y la eficacia de las medidas preventivas. Es crucial realizar investigaciones para identificar los virus circulantes y secuenciar su genoma, lo que permitirá mejorar la salud pública y desarrollar intervenciones más efectivas contra esta enfermedad en México.

### 4

#### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo ha evolucionado y se ha dispersado el virus sincitial respiratorio en el noreste de México durante la temporada invernal 2023-2024, y qué factores han influido en su dinámica poblacional y espacial en esta región?

## OBJETIVOS

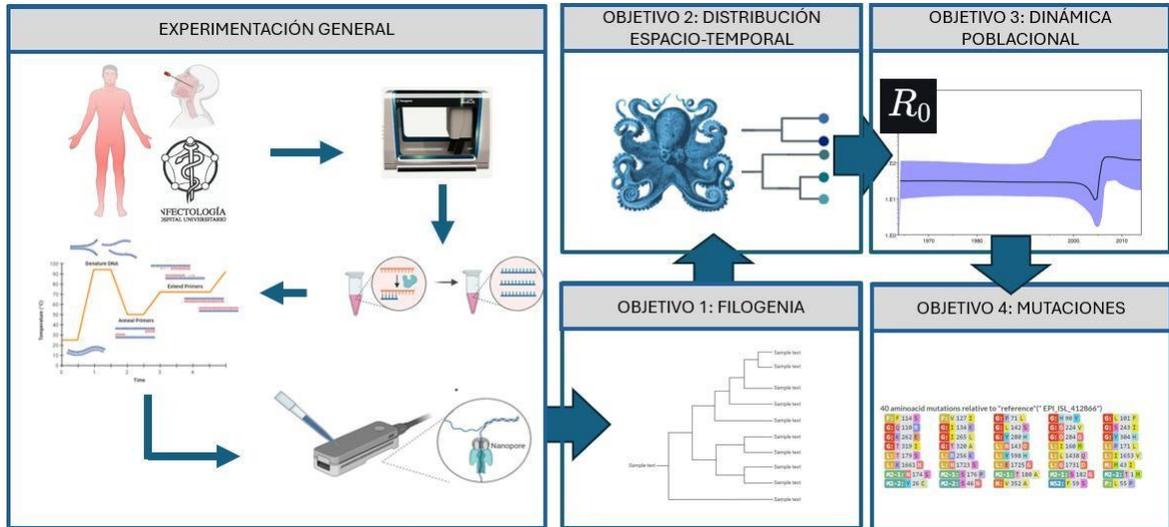
### 5.1 General

Analizar la evolución y dispersión del virus sincitial respiratorio en el noreste de México durante la temporada invernal 2023-2024, identificando los factores que han influido en su dinámica poblacional y espacial en esta región.

### 5.2 Específicos

1. Establecer las relaciones filogenéticas de los virus aislados en el noreste de México en el periodo invernal 2023-2024.
2. Determinar la propagación espaciotemporal de los virus aislados y reportados en México.
3. Analizar la transmisión y la dinámica poblacional del virus sincitial respiratorio en México.
4. Identificar potenciales adaptaciones evolutivas del virus sincitial respiratorio circulante en México.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL GENERAL



**Figura 3. Diagrama experimental general.** **OBJETIVO 1.** Recolección de muestras nasofaríngeas, extracción de ARN viral con Nimbus (Seegene), transcripción inversa, amplificación y secuenciación del genoma viral para construir árboles de máxima verosimilitud y analizar relaciones filogenéticas. **OBJETIVO 2.** Uso de BEAST para generar árboles de máxima credibilidad calibrados en tiempo y espacio, observando la distribución espacio-temporal. **OBJETIVO 3.** Inferencia demográfica con BEAST mediante Bayesian Skyline Plot para graficar reconstrucciones demográficas. Aplicación de modelos de coalescencia exponencial o Birth-Death, según corresponda, para estimar  $R_0$  y validar datos con Tracer. **OBJETIVO 4.** Generación de reportes de mutaciones de genomas secuenciados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Tipo de estudio

El diseño metodológico se clasifica como observacional, transversal, descriptivo, no ciego.

### 7.2 Obtención de muestras

Se obtuvieron 57 muestras clínicas e información demográfica de pacientes que acudieron por atención médica a la Torre HU del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El periodo de recolección fue del 2 de octubre de 2023 al 20 de mayo de 2024. Se empleó la muestra de ARN residual que se utilizó para realizar el diagnóstico de Virus Sincitial Respiratorio por medio de RT-qPCR con CT  $\leq 25$  a través del ensayo Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV (Seegene Technologies)

### 7.3 Criterios

#### 7.3.1 Inclusión

Pacientes que, en los últimos 5 días, para los casos de enfermedad similar a la influenza (Ambulatoria) y en los últimos 7 días para los casos de infección respiratoria aguda grave (Hospitalizada) ha presentado al menos uno de los siguientes signos y síntomas:

- Tos
- Fiebre
- dolor de cabeza

Acompañados de al menos uno de los siguientes signos o síntomas:

|                |                |
|----------------|----------------|
| Disnea         | Polipnea       |
| Mialgias       | Anosmia        |
| Artralgias     | Disgeusia      |
| Odinofagias    | Conjuntivitis. |
| Escalofríos    |                |
| Dolor torácico |                |

**Tabla 1.** Signos y síntomas de enfermedad respiratoria viral.

### 7.3.2 Exclusión

- Pacientes que tengan más de siete días de evolución de los síntomas, con cuadros respiratorios recurrentes o con otra causa de infección aparente.
- Pacientes a los cuales no se les detecte ARN de Virus Sincitial Respiratorio por medio de RT-qPCR.
- Personas menores a 18 años o en estado de gestación.

### 7.3.3 Eliminación

- Falta de fecha de recolección
- Contaminación de las muestras.
- Muestra insuficiente.
- Muestra degradada.

## OBJETIVO 1: FILOGENIA

### 8.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante el uso de un kit de cartucho universal STARMag (Seegene Technologies, Seúl, Corea del Sur) en una estación de extracción automática Nimbus (Seegene Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección del VRS se realizó con el ensayo Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV (Seegene Technologies), y posteriormente se aceptaron las muestras que obtuvieran un Ct <25 para su procesamiento posterior.

### 8.2 Transcripción inversa

La transcripción inversa se efectuó utilizando la enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) en conjunto con cebadores específicos. Para la preparación de los primers, se mezclaron 10 µL de cebadores a una concentración de 10 µM en un tubo Eppendorf nuevo, y se diluyeron con 40 µL de agua ultrapura para obtener una concentración final de 2 µM.

| Primer               | Secuencia (5'-3')         |
|----------------------|---------------------------|
| RSVA-Fragmento 1-Fw  | AAAAATGCGTACWACAAACTTGC   |
| RSVA-Fragmento 1-Rev | GTTGGTCCTTGGTTTTGGAC      |
| RSVA-Fragmento 2-Fw  | CACAGTGA CTGACAACAAAGGAG  |
| RSVA-Fragmento 2-Rev | GCTCATGGCAACACATGC        |
| RSVA-Fragmento 3-Fw  | CGAGGTCATTGCTTGAATGG      |
| RSVA-Fragmento 3-Rev | CACCACCACCAAATAACATGG     |
| RSVA-Fragmento 4-Fw  | AGGGTGGTGTCAAAA ACTATGG   |
| RSVA-Fragmento 4-Rev | ACGAGAAAAAAAGTGTCAAAA ACT |
| RSVB-Fragmento 1-Fw  | AAAAATGCGTACTACAAACTTGC   |
| RSVB-Fragmento 1-Rev | TTGTGCTTGGCTTGTGTTTC      |
| RSVB-Fragmento 2-Fw  | AAGGGTTAGCCCATCCAAMC      |

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| RSVB-Fragmento 2-Rev | TGCTAAGGCTGATGTCTTTCC  |
| RSVB-Fragmento 3-Fw  | GTCCTCGTCTGARCAAATTGC  |
| RSVB-Fragmento 3-Rev | TAGGTCCTCTTTCACCACGAG  |
| RSVB-Fragmento 4-Fw  | GAGGGATCCACAGGCTTTAGG  |
| RSVB-Fragmento 4-Rev | ACGAGAAAAAAGTGTCAAAAAC |

**Tabla 2.** Cebadores específicos para Virus Sincitial Respiratorio tipo A y tipo B. INFORM-RSV Langedijk *et al.* (2020)

### 8.3 Protocolo de transcripción inversa

Preparación inicial:

Se preparó la mezcla inicial con los siguientes componentes:

| Componente                    | Volumen    |
|-------------------------------|------------|
| Primers específicos 2 $\mu$ M | 1 $\mu$ L  |
| 10mM dNTPs mix                | 1 $\mu$ L  |
| Templado ARNv                 | 11 $\mu$ L |
| TOTAL                         | 13 $\mu$ L |

**Tabla 3.** Mezcla de mix #1 para la transcripción inversa de VSR.

La mezcla se colocó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) a 65 °C durante 5 minutos, seguida de un enfriamiento en hielo durante 1 minuto.

Preparación del segundo mix:

Antes de continuar, se homogeneizaron mediante vortex y centrifugación del buffer 5x SSIV. Posteriormente, se combinó lo siguiente en un tubo Eppendorf:

| Componente                           | Volumen   | Concentración final |
|--------------------------------------|-----------|---------------------|
| 5x SSIV Buffer                       | 4 $\mu$ L | 1x                  |
| 100 mM DDT                           | 1 $\mu$ L | 5 mM                |
| RNase OUT                            | 1 $\mu$ L | 0.29 U/ $\mu$ L     |
| SuperScript IV Reverse Transcriptase | 1 $\mu$ L | 28.6 U/ $\mu$ L     |
| TOTAL                                | 7 $\mu$ L |                     |

**Tabla 4.** Mezcla de mix #2 para la transcripción inversa de VSR

Reacción de transcripción inversa:

Se añadió la mezcla de primers y ARN templado al segundo mix preparado, obteniendo un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

- 52 °C durante 10 minutos.
- 80 °C durante 10 minutos.
- 4 °C indefinidamente.

Digestión con RNase H:

Debido a que se esperaban fragmentos de ADNc superiores a 1 kb, se añadieron 1  $\mu\text{L}$  de RNase H (New England Biolabs), teniendo una concentración final de 0.1 U/ $\mu\text{L}$  a la mezcla y se incubó a 37 °C durante 20 minutos para eliminar restos de ARN templado.

#### 8.4 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La amplificación del genoma se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), conocida por su alta precisión en la síntesis de ADN.

Preparación de la mezcla de reacción

Se preparó un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  por muestra siguiendo la composición descrita a continuación:

| Componente              | Volumen             | Concentración final   |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 5x Q5 Reaction Buffer   | 5 $\mu\text{L}$     | 1x                    |
| 10mM dNTPs              | 0.5 $\mu\text{L}$   | 200 $\mu\text{M}$     |
| 10mM Forward Primer     | 1.25 $\mu\text{L}$  | 0.5 $\mu\text{M}$     |
| 10mM Reverse Primer     | 1.25 $\mu\text{L}$  | 0.5 $\mu\text{M}$     |
| Templado                | 4 $\mu\text{L}$     | < 1000 ng             |
| Q5 Hot Start Polymerase | 0.25 $\mu\text{L}$  | 0.02 U/ $\mu\text{l}$ |
| Agua                    | 12.75 $\mu\text{L}$ |                       |
| TOTAL                   | 25 $\mu\text{L}$    |                       |

**Tabla 5.** Tabla de mezcla de mix para PCR de Virus Sincitial Respiratorio

## 8.5 Programa del termociclador

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador bajo el siguiente programa de temperaturas:

| Paso                      | Temperatura | Tiempo          | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-----------------|--------|
| Desnaturalización Inicial | 98°C        | 30 segundos     | 1      |
| Desnaturalización         | 98°C        | 10 segundos     | 40     |
| Alineación                | 61°C        | 10 segundos     |        |
| Extensión                 | 72°C        | 3 minutos       |        |
| Extensión final           | 72°C        | 4 minutos       | 1      |
| Conservación              | 10°C        | Indefinidamente |        |

**Tabla 6.** Programa de PCR para Virus Sincitial Respiratorio

## 8.6 Control de integridad y cuantificación del genoma viral

### 8.6.1 Gel de agarosa

La integridad de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con el intercalante SybrSafe, lo que permitió confirmar la calidad de los amplicones generados.

Finalmente, la cuantificación del ADN purificado se realizó mediante fluorimetría empleando el equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific) , usando 1  $\mu$ L de ADNc, lo que garantizó mediciones precisas de la concentración del ADN obtenido para su posterior análisis.

### 8.6.2 Purificación de amplicones de ADNc

Las perlas magnéticas (beckman coulter diagnostics) fueron resuspendidas mediante vortex, dejando la mezcla a temperatura ambiente.

Una vez completada la amplificación del ADNc viral, se transfirió el volumen total de la reacción (25  $\mu$ L) a tubos nuevos de 1.5 mL, previamente rotulados.

Se añadieron 21.6  $\mu\text{L}$  de magnéticas AMPure XP a cada muestra y se mezclaron suavemente utilizando un mezclador tipo hula durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas brevemente y colocadas en un separador magnético durante 2 minutos para permitir la separación de las partículas magnéticas del sobrenadante. Una vez separadas, se retiró cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta, asegurándonos de no dispersar las partículas magnéticas. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a cada muestra, dispensando el líquido lentamente sobre la pared opuesta a las partículas magnéticas. Las muestras se incubaron durante 30 segundos a temperatura ambiente y se retiró el etanol cuidadosamente. Este proceso de lavado se repitió una vez más, para un total de dos lavados.

Después del último lavado, se eliminó el exceso de etanol residual colocando las muestras nuevamente en el separador magnético durante 30 segundos y aspirando cuidadosamente los restos con una pipeta de 10  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se retiraron las muestras del magneto y se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de solución de elución a cada una. Se mezclaron mediante pipeteo 10 veces para asegurar una completa homogenización y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron colocadas nuevamente en el separador magnético durante 2 minutos para recuperar el eluato, el cual se transfirió a tubos o placas nuevas, asegurándose de no tocar las partículas magnéticas.

## **8.7 Preparación de biblioteca**

Se siguió el protocolo *Rapid sequencing V14 - Amplicon sequencing (SQK-RBK114.24)* proporcionado por Oxford Nanopore Technologies.

Se programó el termociclador con un ciclo inicial a 30 °C durante 2 minutos, seguido de 80 °C durante 2 minutos. Mientras tanto, se descongelaron los reactivos del kit a temperatura ambiente, se centrifugaron brevemente y se mezclaron por pipeteo. El ADN necesario para la preparación de las bibliotecas se preparó en agua libre de nucleasas, ajustando un volumen de 9  $\mu\text{L}$  por muestra

con aproximadamente 50 ng de ADN amplificado. Una vez listos las diluciones, se mezclaron por pipeteo y se centrifugaron brevemente.

Cada muestra se colocó en tubos eppendorf de 0.2 ml, seleccionando un código de barras único para cada muestra procesada en el mismo flujo. Para cada muestra, se prepararon 9  $\mu\text{L}$  de ADN molde y 1  $\mu\text{L}$  del código de barras (Rapid Barcode), totalizando un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . Los componentes se mezclaron completamente por pipeteo, se centrifugaron brevemente y se incubaron en el termociclador a 30 °C durante 2 minutos y luego a 80 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se enfriaron brevemente en hielo, se centrifugaron y se recogió el líquido en el fondo de los tubos.

Se combinaron todas las muestras codificadas en un tubo de 1.5 ml de Eppendorf LoBind, obteniendo un volumen total de 120  $\mu\text{L}$  debido a que se procesaron 6 muestras por duplicado y por cada muestra se requieren 10  $\mu\text{L}$ . Las partículas magnéticas AMPure XP (AXP) se resuspendieron mediante vortex y se añadió un volumen igual de estas a la mezcla combinada (120  $\mu\text{L}$ ). El tubo se mezcló con suaves golpes y se incubó en un mezclador rotatorio (Hula mixer) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de la incubación, se prepararon 3 ml de etanol fresco al 80 % en agua libre de nucleasas. Las muestras fueron centrifugadas, y el sobrenadante se separó utilizando un imán. Se realizaron dos lavados con 1.5 ml de etanol al 80 %, cuidando no perturbar las partículas magnéticas, y el etanol residual se eliminó cuidadosamente tras una breve centrifugación. Las partículas se dejaron secar por 30 segundos, evitando el agrietamiento del *pellet*.

Finalmente, el pellet se resuspendió en 15  $\mu\text{L}$  de buffer de elución (EB) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las partículas magnéticas se separaron en el imán hasta que el eluato quedó claro y sin color, recuperando 15  $\mu\text{L}$  del eluato en un tubo limpio de 1.5 ml de Eppendorf LoBind. El ADN de la biblioteca resultante se transfirió, separando 11  $\mu\text{L}$  para el siguiente paso.

En un tubo nuevo, se diluyó el adaptador rápido (RA) mezclando 1.5  $\mu\text{L}$  de RA con 3.5  $\mu\text{L}$  de buffer adaptador (ADB), totalizando 5  $\mu\text{L}$ . A continuación, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de esta mezcla al ADN codificado, mezclando suavemente y centrifugando brevemente. La reacción se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, completando así la preparación de la biblioteca de ADN.

### **8.8 Carga de celda Flongle**

Se descongelaron a temperatura ambiente el Sequencing Buffer (SB), las perlas magnéticas de la biblioteca (Library Beads, LIB), el Flow Cell Flush (FCF) y el Flow Cell Tether (FCT). Los tubos de SB, FCT y LIB fueron mezclados mediante vortex y se centrifugaron brevemente, también a temperatura ambiente.

En un tubo de 1.5 mL, se preparó la solución de carga mediante la mezcla de 117  $\mu\text{L}$  de FCF con 3  $\mu\text{L}$  de FCT, y se homogeneizó mediante pipeteo. Mientras tanto, se despegó parcialmente el sello de la celda de flujo (Flongle flow cell), exponiendo únicamente el puerto de muestra. Para mantener el sello abierto, se fijó al lid del MinION usando la pestaña adhesiva del mismo sello.

Se utilizó una pipeta de 200  $\mu\text{L}$  para cargar la solución, verificándose que no quedaran burbujas de aire en su interior, ya que estas podrían dañar los nanoporos al entrar en contacto con ellos. En caso de detectarse aire, se ajustó el dial de la pipeta hacia abajo hasta que un pequeño volumen de líquido formara una gota externa en la punta. Esta gota se colocó en contacto con el puerto de muestra, asegurándose de que la punta estuviera firmemente posicionada antes de iniciar la carga.

Una vez posicionada la punta de la pipeta en el puerto de muestra, se ajustó lentamente el dial, observándose que una pequeña cantidad de líquido amarillo verdoso retrocedía en la punta, lo que confirmó la ausencia de burbujas de aire. Tras esta verificación, la solución de carga fue dispensada en la celda de flujo de manera controlada, girándose el dial lentamente hacia el cero.

Durante la carga, se observó cómo el líquido de almacenamiento era desplazado hacia el puerto de desecho de la celda. La carga se detuvo justo

antes de que el líquido en la punta alcanzara el fondo, con el fin de evitar la introducción de aire en la celda de flujo.

## **8.9 Secuenciación**

En el software MinKNOW, se configuró para una secuenciación de 16 horas.

## **8.10 Procesamiento y análisis de datos de secuenciación**

Tras la corrida de secuenciación, se realizó el llamado de bases y demultiplexado utilizando Dorado v0.6<sup>44</sup> y guppy\_barcode v. 6.5.8.<sup>45</sup> Dorado es una herramienta optimizada para la interpretación de datos provenientes de secuenciadores de tercera generación, mientras que guppy\_barcode se encarga de separar las lecturas de diferentes muestras basándose en barcodes previamente asignados.

Para el alineamiento de las lecturas al genoma de referencia (NC\_038235.1), se utilizó minimap2 v. 2.28<sup>46</sup>, una herramienta rápida y eficiente diseñada para el mapeo de secuencias largas contra genomas de referencia. El procesamiento posterior incluyó el llamado de variantes mediante medaka v. 1.8.1<sup>47</sup>, una herramienta que aprovecha la capacidad de aprendizaje automático para predecir variantes genéticas con alta precisión, y bcftools v. 1.17<sup>48</sup>, un programa que permite la manipulación y análisis de datos de variantes en formato VCF/BCF. Finalmente, se utilizó samtools v. 1.21<sup>48</sup>, para procesar y manejar los archivos de alineamiento en formato SAM/BAM y para generar el genoma consenso.

El ensamblado del genoma y la verificación de su calidad se realizaron con Nextclade<sup>49</sup>, una herramienta en línea que evalúa la integridad y precisión del ensamblado mediante una clasificación visual tipo semáforo, indicando si existen errores.

Una vez validada la calidad del genoma ensamblado, este fue anotado empleando VAPiD (Viral Annotation and Identification Pipeline) v. 1.0.0<sup>50</sup>, que permite identificar y anotar genes virales y regiones funcionales de manera

automatizada. Con el genoma anotado, la secuencia fue preparada y enviada para su publicación en GenBank.

### **8.11 Construcción y análisis filogenético**

Para el análisis comparativo, se descargaron secuencias del VSR a partir de bases de datos públicas, como Nucleotide BLAST. Inicialmente, se obtuvieron secuencias correspondientes a muestras recolectadas en territorio mexicano, y posteriormente se incorporaron secuencias de distribución global. Todas las secuencias seleccionadas cumplieron con criterios de calidad previamente establecidos: haber sido recolectadas entre 2015 y 2025, presentar una similitud superior al 99.5 % con los genomas obtenidos en el laboratorio, contar con una cobertura mayor al 99 % de la región correspondiente a la proteína G del VSR, pertenecer a clados identificados como circulantes en México, y disponer de información completa sobre la fecha de recolección y localización geográfica, obteniendo un total de 1841 secuencias.

Dado que las secuencias recolectadas en territorio mexicano fuera del estado de Nuevo León únicamente contenían información correspondiente a la proteína G del VSR, fue necesario adaptar las secuencias globales a dicha región específica con el fin de garantizar la validez de los análisis filogenéticos posteriores. Para ello, se utilizó la herramienta MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)<sup>51</sup> v. 7.505, reconocida por su eficiencia y precisión en la alineación de múltiples secuencias genómicas.

Mediante esta herramienta, se identificó y recortó la región correspondiente a la proteína G en las secuencias globales obtenidas, asegurando una alineación adecuada entre las secuencias locales y globales, paso fundamental para el desarrollo de análisis filogenéticos consistentes.

El archivo obtenido en formato FASTA resultante fue utilizado para la construcción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud mediante IQ-TREE2 v. 2.2.3.<sup>52</sup>

Como resultado del análisis, el mejor modelo seleccionado fue GTR+F+I+G4<sup>53</sup>, el cual contempla tasas de sustitución generalizadas (GTR), frecuencias de bases observadas (F), sitios invariantes (I) y una distribución gamma con cuatro categorías discretas (G4) para modelar la heterogeneidad de tasas entre sitios.

Para evaluar la confianza estadística de las ramas del árbol, se utilizaron dos métodos de soporte: bootstrap ultrarrápido<sup>54</sup> con -B 1000, que genera 1000 réplicas para estimar la confiabilidad de las agrupaciones, y el test SH-aLRT con -alrt 1000, que también realiza 1000 replicaciones para evaluar la robustez de las ramas bajo el método de razón de verosimilitud aproximada.

Finalmente, el parámetro -T AUTO permitió que el software optimizara automáticamente el uso de recursos del sistema, utilizando todos los núcleos de procesamiento disponibles para agilizar el análisis. Esta etapa fue clave para generar un árbol filogenético confiable y estadísticamente soportado, sobre el cual se basaron las interpretaciones evolutivas y epidemiológicas del VSR en esta investigación.

Se generó un archivo con extensión *treefile* que posteriormente fue visualizado con FigTree v. 1.4.4<sup>54</sup> un software especializado en la representación gráfica de árboles evolutivos que permite personalizar el diseño para destacar relaciones evolutivas y anotaciones relevantes.

## 9

### **OBJETIVO 2: DISTRIBUCIÓN ESPACIOTEMPORAL**

Para analizar la señal temporal y la regularidad de la filogenia, se empleó TEMPEST v. 1.5.3<sup>56</sup>, una herramienta que evalúa la correlación entre la distancia genética de las secuencias y sus fechas de muestreo. Esto permitió confirmar la idoneidad de los datos para realizar inferencias filogenéticas calibradas en el tiempo.

Posteriormente, se utilizó la herramienta BEAUti v2.7.6<sup>57</sup> (la versión más reciente disponible al momento del análisis), perteneciente al paquete de

programas BEAST, con el objetivo de preparar el archivo XML necesario para la inferencia filogenética bayesiana en BEAST<sup>58</sup>.

Primero, se agregaron las particiones necesarias para el análisis. La primera partición correspondió al archivo FASTA generado a partir del alineamiento múltiple de secuencias mediante MAFFT, que incluía un total de 1841 secuencias, tanto mexicanas como globales. La segunda partición correspondió a la información del país de origen de cada una de las secuencias, lo que permitió incorporar un enfoque de estructura espacial al análisis filodinámico.

Posteriormente, se importaron las fechas de muestreo de cada secuencia mediante un archivo TSV (tab-separated values), lo cual es indispensable para los análisis temporales en BEAST, ya que permite calibrar el reloj molecular.

Para el análisis, se seleccionó el modelo de sustitución GTR (General Time Reversible), el cual permite tasas diferentes para cada tipo de cambio entre nucleótidos, siendo uno de los modelos más flexibles y completos. Como modelo de heterogeneidad de sitios, se empleó Gamma (equal weights) + Invariant sites, el cual contempla que:

Algunos sitios evolucionan a diferentes velocidades (modelo Gamma), con una distribución de tasas dividida en 4 categorías para una mejor aproximación de la variabilidad entre sitios.

Algunos sitios son invariables, es decir, permanecen sin cambios a lo largo del tiempo, lo cual mejora el ajuste del modelo a los datos reales.

Se utilizó un reloj molecular estricto, el cual asume una tasa constante de evolución a lo largo de todas las ramas del árbol. Este tipo de modelo es adecuado cuando no hay evidencia de grandes variaciones en las tasas de mutación entre linajes.

Como tree prior, se seleccionó el modelo *Coalescent: Bayesian Skygrid*, el cual permite modelar cambios en el tamaño poblacional efectivo a lo largo del tiempo sin asumir una forma específica de crecimiento o decrecimiento. Este

enfoque utiliza múltiples intervalos de tiempo ("rejilla temporal") para estimar la variación demográfica de forma flexible, siendo especialmente útil en estudios de virus con alta variabilidad genética y dinámica epidémica.

El modelo Bayesian Skygrid fue configurado con los siguientes parámetros:

- Número de parámetros (grid points): 16
- Tiempo del último punto de transición (time of last transition point): 8

Estos valores se eligieron con base en el rango temporal de las secuencias, ya que la muestra más antigua tenía 8 años de antigüedad, y se esperaba que hubiese aproximadamente dos muestreos por año, por lo que se definieron 16 intervalos de tiempo para captar con mayor resolución los cambios en la dinámica poblacional del virus.

La longitud de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) fue de 300,000,000 pasos, garantizando una muestra suficientemente amplia del espacio de parámetros para lograr una buena convergencia del análisis. Una vez definidos todos los parámetros, se generó el archivo XML, el cual fue utilizado como entrada para correr el análisis en BEAST.

Una vez generado el archivo XML con todos los parámetros y configuraciones previamente descritas, se procedió a realizar el análisis filodinámico utilizando el programa BEAST, en su versión 2.7.6.

El archivo `alnt_mundo_skygrid_300.xml` contenía la información completa del análisis, incluyendo las secuencias alineadas, las fechas de muestreo importadas desde un archivo TSV, el modelo de sustitución GTR, el modelo de heterogeneidad de sitios Gamma con pesos iguales más sitios invariantes (G4+I), el reloj molecular estricto, y el modelo coalescente Bayesian Skygrid. Este último configurado con un número de parámetros igual a 28 y un tiempo del último punto de transición de 14, lo cual permitió capturar adecuadamente las fluctuaciones del tamaño poblacional efectivo del virus a lo largo del tiempo, bajo el supuesto de dos puntos de muestreo por año durante los 14 años cubiertos por los datos, siendo el aislamiento más antiguo del año 2016. Finalmente, la inclusión del

operador `&>` `beast.log` redirigió tanto la salida estándar como los mensajes de error al archivo `beast.log`, lo cual permitió dar seguimiento al avance del análisis y detectar cualquier posible error durante su ejecución. Con esto, el análisis filodinámico pudo llevarse a cabo de forma robusta, integrando secuencias locales y globales del virus sincitial respiratorio para la inferencia de relaciones evolutivas y estimaciones demográficas a lo largo del tiempo.

Posteriormente a la ejecución del análisis en BEAST, se generaron diversos archivos como resultado del proceso de inferencia bayesiana. Entre ellos, el archivo de mayor interés para la evaluación inicial del análisis fue el que posee la extensión `.log`, ya que contiene los valores de los parámetros estimados durante el muestreo por MCMC (Markov Chain Monte Carlo), incluyendo su distribución posterior, medias, desviaciones estándar y, de forma crucial, el tamaño efectivo de muestra o Effective Sample Size (ESS). Este archivo fue analizado utilizando el programa TRACER<sup>59</sup>, en su versión más reciente, la 1.7.2, el cual es una herramienta ampliamente utilizada en estudios filodinámicos para evaluar la convergencia y calidad de los análisis realizados en BEAST.

Posterior a verificar mediante TRACER que se obtuvo un ESS superior a 200 en todos los parámetros analizados, lo cual indica una adecuada convergencia y calidad en el muestreo de la cadena MCMC, se procedió a realizar el anotado del árbol filogenético mediante el uso del programa TreeAnnotator, en su versión más reciente (v2.7.6)<sup>60</sup>, el cual forma parte del paquete BEAST. TreeAnnotator es una herramienta diseñada para resumir una colección de árboles generados durante un análisis bayesiano y condensarlos en un único árbol representativo, que conserva la estructura filogenética más probable de acuerdo con las estimaciones posteriores.

Este árbol anotado facilita la visualización e interpretación de las relaciones evolutivas, integrando información clave como las probabilidades posteriores de cada nodo (posterior probabilities), alturas de nodo (node heights), intervalos de credibilidad y otras métricas relevantes derivadas del análisis bayesiano. Para la

generación del árbol final, se utilizaron los siguientes parámetros dentro de TreeAnnotator:

Burnin: 30,000,000, lo cual corresponde al 10% de la cadena total de 300 millones de pasos. Este parámetro indica que las primeras 30 millones de muestras fueron descartadas, ya que al inicio de la cadena las estimaciones aún no han alcanzado la estabilidad y podrían sesgar el resultado final. El burn-in es un paso crítico para asegurar que solo se consideren las muestras obtenidas durante el estado estacionario de la cadena.

El Posterior probability limit fue fijado en 0.0, lo que significa que se consideraron todos los nodos en el árbol, independientemente de su soporte posterior. Esto permite conservar toda la estructura filogenética inferida, aunque en algunos casos podría incluir nodos con bajo soporte, lo cual debe interpretarse con precaución en el análisis visual posterior.

En cuanto al Target tree type, se seleccionó el Maximum Clade Credibility Tree (MCCT). Este tipo de árbol es el que presenta la mayor suma de probabilidades posteriores en sus clados y es considerado el árbol más representativo del conjunto de árboles muestreados. Su uso es estándar para resumir y presentar los resultados filogenéticos bayesianos.

Finalmente, para el parámetro de Node heights, se eligió la opción Median heights, la cual asigna a cada nodo la mediana de las alturas (fechas o tiempos) observadas en los árboles de la muestra posterior. Esta elección proporciona una estimación robusta y menos sensible a valores extremos, permitiendo representar de forma más precisa las divergencias temporales en la evolución del virus.

Con estos parámetros, TreeAnnotator generó el árbol anotado final en formato *.tree*

Este enfoque integrado permitió modelar la evolución del virus en un contexto temporal y geográfico, proporcionando información clave sobre su dinámica de dispersión y diversificación

### OBJETIVO 3: ANÁLISIS DE TRANSMISIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL

#### 10.1 Análisis de la dinámica poblacional y transmisibilidad

Posteriormente, se aprovechó que durante la preparación del archivo XML en BEAUti se seleccionó como modelo de tree prior el enfoque Bayesian Skygrid, el cual no solo permite inferir un árbol filogenético, sino también realizar un análisis de dinámica poblacional temporal del virus. Este tipo de análisis es fundamental para entender cómo ha cambiado el tamaño efectivo de la población viral a lo largo del tiempo, lo que puede reflejar patrones de transmisión, brotes epidémicos o introducción de nuevas variantes.

El modelo Bayesian Skygrid es una extensión del modelo Skyline que permite una mayor resolución temporal al dividir el intervalo de tiempo en múltiples puntos de cambio en la población. Para este análisis, se configuraron los siguientes parámetros clave dentro de BEAUti: se estableció un número de parámetros igual a 16 y un tiempo del último punto de transición de 8, con el objetivo de capturar dos puntos de muestreo por año, en correspondencia con los 8 años que abarca nuestro conjunto de datos, ya que la secuencia más antigua analizada data del año 2016. Esta configuración permite observar con mayor detalle los posibles cambios en la dinámica poblacional del VSR, como crecimientos, cuellos de botella o estabilizaciones.

Luego de haber completado el análisis en BEAST y obtenido los archivos resultantes, se utilizó nuevamente el programa TRACER para visualizar y analizar la dinámica poblacional inferida. TRACER es una herramienta esencial en los análisis bayesianos, ya que permite evaluar la convergencia de parámetros mediante el cálculo del Effective Sample Size (ESS), pero además incluye una función específica para reconstrucción demográfica.

En la pestaña *Analysis*, se seleccionó la opción *Skygrid Reconstruction*, donde se puede visualizar la reconstrucción temporal del tamaño efectivo poblacional a lo largo de los años. Se ingresó como fecha de la muestra más

reciente el valor decimal 2025.0520, correspondiente a los primeros días del año 2025. Posteriormente, se ajustaron manualmente los ejes del gráfico para delimitar el periodo de análisis desde 2016.9480 hasta 2025.0520, permitiendo así observar con claridad la evolución del tamaño poblacional del VSR en los últimos 8 años, que incluyen tanto los brotes recientes como posibles fluctuaciones causadas por factores epidemiológicos o evolutivos.

Esta visualización facilitó una interpretación directa de los patrones de transmisión del virus, permitiendo inferencias valiosas sobre su comportamiento epidémico en México y a nivel global durante el periodo 2015-2025.

## 11

### **OBJETIVO 4: IDENTIFICACIÓN DE ADAPTACIONES EVOLUTIVAS**

#### **11.1 Análisis de Mutaciones y Resistencia a Tratamientos**

El análisis de las secuencias generadas en el laboratorio se llevó a cabo utilizando la herramienta en línea Nextclade. Este software es esencial para evaluar la calidad de los genomas obtenidos, ya que permite identificar errores de ensamblaje, medir la calidad general de las secuencias y generar un reporte detallado de las mutaciones presentes en comparación con genomas de referencia. En este caso, se utilizan como referencia:

- EPI\_ISL\_412866 para el subtipo A del virus sincitial respiratorio (RSV-A).
- EPI\_ISL\_1653999 para el subtipo B del virus sincitial respiratorio (RSV-B).

Nextclade también proporciona información precisa sobre las ubicaciones de las mutaciones en el genoma, facilitando un análisis detallado de su posible impacto.

Posteriormente, las mutaciones identificadas fueron contrastadas con reportes en la literatura científica para determinar si están asociadas con resistencia a tratamientos basados en anticuerpos monoclonales y vacunas aprobadas.

## RESULTADOS OBJETIVO 1

De las 57 muestras obtenidas a través de la colaboración con el Servicio de Infectología del Hospital Universitario, se observó que el 46% correspondían a pacientes del sexo femenino, mientras que el 54% pertenecían a pacientes del sexo masculino. Estas muestras cubren un periodo comprendido entre la semana epidemiológica 44 del año 2023 y la semana epidemiológica 5 del año 2024, lo que refleja la temporada invernal, periodo en el cual se presenta el mayor número de casos de infección por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR).

Cabe destacar que todas las muestras seleccionadas presentaron un valor de CT (Cycle Threshold) menor a 25, criterio que indica una alta carga viral y que fue utilizado como punto de corte para garantizar la calidad y eficiencia en los pasos posteriores de análisis molecular. Las 57 muestras fueron debidamente procesadas, entendiéndose por procesamiento la realización de los siguientes pasos: la retrotranscripción del ARN viral a ADNc, seguida por la amplificación de las regiones génicas de interés mediante PCR, y finalmente la secuenciación de tercera generación para su posterior análisis bioinformático y filogenético.

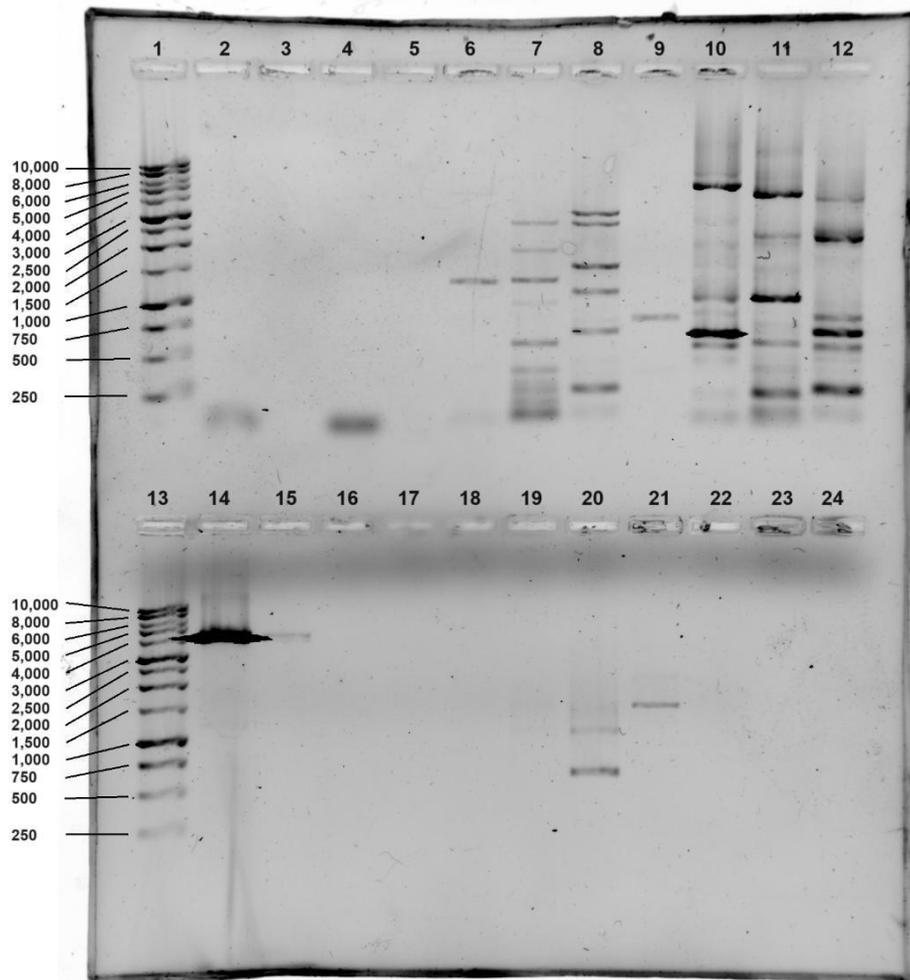
Posterior a la retrotranscripción del ARN viral a ADNc, se llevó a cabo una etapa de control de calidad esencial para asegurar la viabilidad de las muestras en los pasos posteriores. Esta etapa consistió en la cuantificación del ADNc obtenido mediante fluorimetría, utilizando el equipo Qubit, el cual ofrece una medición precisa y sensible de ácidos nucleicos, lo que permite conocer la concentración real de ADNc presente en cada muestra obteniendo los siguientes resultados:

| ID Muestra | Concentración     |
|------------|-------------------|
| 92777      | 0.222 ng/ $\mu$ L |
| 93484      | 11.2 ng/ $\mu$ L  |
| 93557      | 13.8 ng/ $\mu$ L  |

**Tabla 7.** Concentración obtenida por cada muestra por medio de fluorimetría en el dispositivo Qiubit

Posterior a verificar la presencia y concentración de ADNc en las muestras mediante análisis por fluorimetría utilizando el equipo Qubit, se continuó con el protocolo experimental llevando a cabo la etapa de amplificación del material genético mediante PCR a punto final. Esta técnica permitió amplificar regiones específicas del genoma del Virus Sincitial Respiratorio, necesarias para su posterior análisis genético.

Una vez completada la amplificación, se procedió a evaluar la calidad del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, técnica que permite separar los fragmentos de ADN en función de su tamaño. Técnica que nos ayuda a confirmar que la amplificación fue exitosa y que los productos generados correspondían al tamaño esperado. Las muestras se visualizaron bajo luz ultravioleta tras la tinción con un agente intercalante, permitiendo observar el patrón de bandas. Se seleccionaron únicamente aquellas muestras que presentaron bandas nítidas y definidas que abarcaran un tamaño estimado entre 3.5 a 4.5 kilobases (kb), correspondiente al rango esperado del fragmento amplificado. Este criterio de selección aseguró que solo las muestras con productos de buena calidad y tamaño adecuado fueran consideradas para su posterior procesamiento en la etapa de secuenciación.



**Gel de agarosa al 1%.** 1. Marcador 1kb DNA Ladder Promega 2. (-) F1 3. (-) F2 4. (-) F3 5. (-) F4 6. 92396-F1-E 7. 92396-F2-E 8. 92396-F3-E 9. 92396-F4-E 10. 93557-F1-E 11. 93557-F2-E 12. 93557-F3-E 13. Marcador 1kb DNA Ladder Promega 14. 93557-F4-E 15. 92396-F1-R 16. 92396-F2-R 17. 92396-F3-R 18. 92396-F4-R 19. 93557-F1-R 20. 93557-F2-R 21. 93557-F3-R 22. 93557-F4-R

**Figura 4. Gel de agarosa al 1%.** Patrón de bandas correspondientes con los amplicones.

Posterior a confirmar la presencia de la amplificación esperada, se procedió a realizar el protocolo de secuenciación por medio de nanoporo. Tras finalizar se realizó el ensamblaje de los genomas y se obtuvieron 3 genomas de longitud completa. Las secuencias presentaron valores de profundidad entre 800x hasta 1996x con una cobertura de 99.80-99.84%

| Secuencia   | Profundidad | Cobertura |
|---|-------------|-----------|
| Human respiratory syncytial virus A isolate RSV-A/MX/UANL-92777/2023, complete genome | 800x        | 99.80%    |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93557, complete genome                    | 1536x       | 99.84%    |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93484, complete genome                    | 1536x       | 99.84%    |

**Tabla 8.** Datos obtenidos de la secuenciación, observando los parámetros de profundidad y cobertura por secuencia.

## 12.1 Control de Calidad

Posterior a la secuenciación y ensamblado del genoma, se verificó la calidad de estas por medio de la herramienta en línea Nextclade, que nos permite observar por medio de un sistema de semáforo la calidad del genoma, permitiéndonos ver parámetros como;

- Mixed Sites. Estos sitios son posiciones en una secuencia donde se detectan múltiples nucleótidos, por ejemplo, A/G o T/C.
- Private Mutations. Estas son mutaciones que están presentes en una secuencia o grupo específico y no en el resto de las secuencias comparadas.
- Frame Shifts. Son alteraciones en el marco de lectura de un gen debido a inserciones o deleciones que no son múltiplos de tres nucleótidos.
- Stop Codons. Estos son codones que indican el fin de la traducción en una proteína.

Se obtuvieron los siguientes resultados

| Sequence name  | QC      |
|--|---------|
| PP790963.1 Human respiratory syncytial virus A isolate RSV-A/MX/UANL-92777/2023, complete genome | M P F S |
| PQ599900.1 Human respiratory syncytial virus A isolate 93557, complete genome                    | M P F S |
| PQ599899.1 Human respiratory syncytial virus A isolate 93484, complete genome                    | M P F S |

**Figura 5.** Sección de ventana de resultados de análisis realizado por la plataforma Nextclade.

Observado que la calidad de la secuenciación y ensamblado fue buena y por lo tanto permite el usar las secuencias para un posterior análisis.

Nextclade también realiza de manera automática la asignación a clados correspondientes de cada muestra, teniendo como resultado la siguiente asignación;

| Secuencia   | Clado    |
|---|----------|
| Human respiratory syncytial virus A isolate RSV-A/MX/UANL-92777/2023, complete genome | A.D.1.5  |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93557, complete genome                    | A.D.1.   |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93484, complete genome                    | A.D.1.5. |

**Tabla 9.** Asignación de clado por secuencia obtenida mediante la plataforma Nextclade.

Seguido se realizó el anotado del genoma utilizando el programa VAPiD y se enviaron las secuencias para su posterior publicación en GenBank, obteniendo los siguientes códigos de acceso:

| Secuencia   | Código de acceso<br>Genbank |
|---|-----------------------------|
| Human respiratory syncytial virus A isolate RSV-A/MX/UANL-92777/2023, complete genome | PP790963.1                  |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93557, complete genome                    | PQ599900.1                  |
| Human respiratory syncytial virus A isolate 93484, complete genome                    | PQ599899.1                  |

**Tabla 10.** Asignación de códigos de acceso al repositorio en línea GenBank.

Posterior a la publicación de los genomas obtenidos en esta investigación en la base de datos GenBank, se procedió a complementar el análisis filogenético descargando metadatos y secuencias adicionales de la plataforma Nextstrain, una herramienta bioinformática interactiva y de código abierto que permite el seguimiento en tiempo real de la evolución de patógenos. Nextstrain integra secuencias genómicas con datos epidemiológicos y geográficos para ofrecer una representación dinámica de la dispersión y evolución de virus como el VSR, siendo una plataforma ampliamente utilizada por la comunidad científica para monitorear variantes, realizar comparaciones entre regiones geográficas y explorar dinámicas evolutivas a lo largo del tiempo.

Con el objetivo de enriquecer el contexto global de los genomas secuenciados en este estudio, se realizó una búsqueda en los metadatos obtenidos de Nextstrain enfocada en secuencias del VSR que cumplieran con criterios de calidad específicos. Se seleccionaron únicamente aquellas secuencias que incluyeran la fecha exacta de recolección, fueran obtenidas en el periodo comprendido entre los años 2015 y 2025, presentaran una cobertura superior al 99% del gen que codifica para la proteína G del VSR, y que estuvieran asociadas con los clados que se ha identificado que circulan dentro del territorio mexicano.

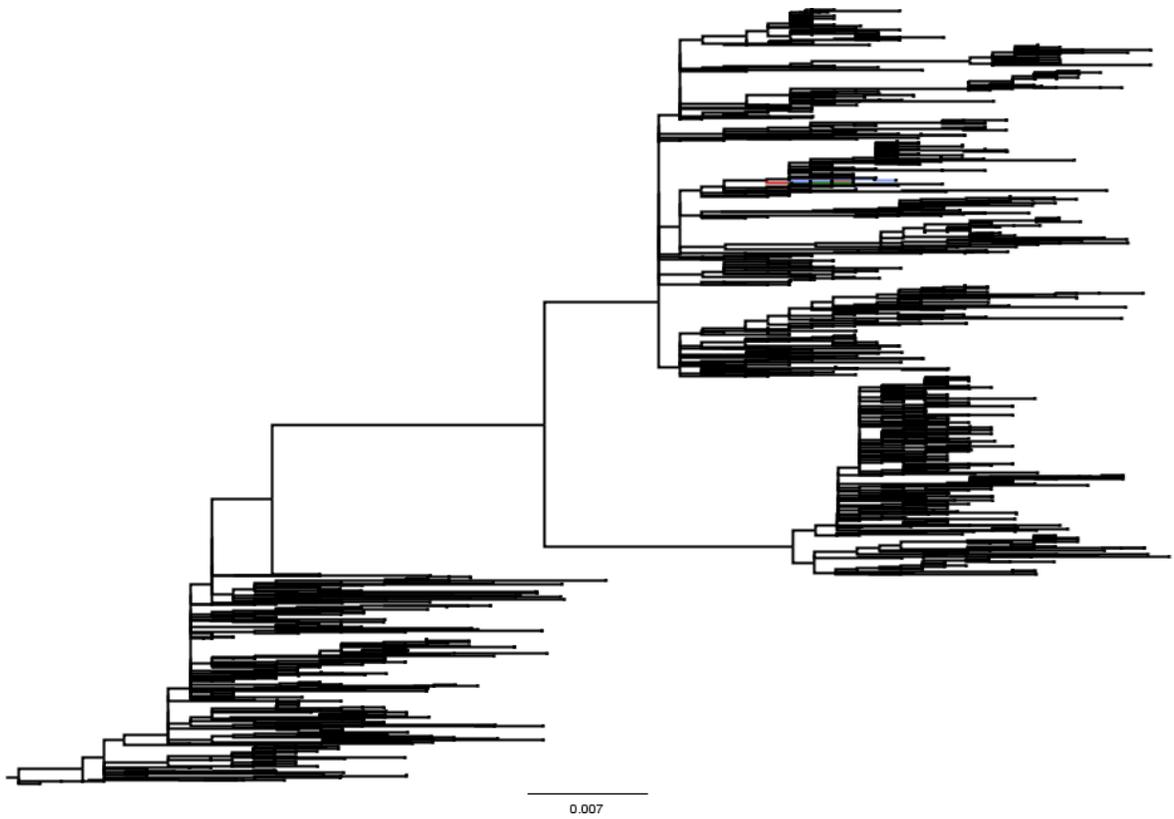
Como resultado de esta búsqueda y filtrado, y una vez integradas también las secuencias mexicanas generadas en el presente estudio, se obtuvo un total de 1841 secuencias de Virus Sincitial Respiratorio.

Posteriormente, se llevó a cabo el alineamiento de las 1841 secuencias seleccionadas utilizando el programa MAFFT, reconocido por su alta precisión y eficiencia en la alineación de múltiples secuencias genómicas. Durante este proceso, se realizó un recorte a aquellas secuencias que correspondían a genomas completos o parciales cuyo tamaño excedía el de la región codificante para la proteína G del VSR. Este paso fue esencial para homogenizar el tamaño de todas las secuencias incluidas en el análisis, permitiendo así una alineación más precisa y garantizando la confiabilidad de los análisis filogenéticos posteriores.

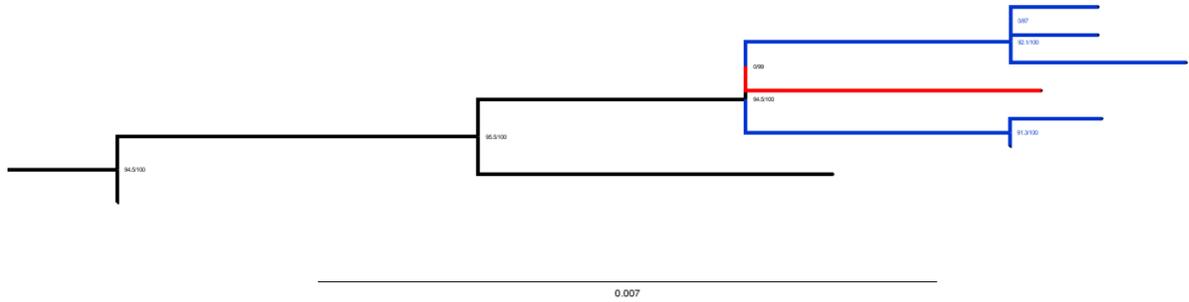
Una vez generado el archivo en formato FASTA a partir del alineamiento, se utilizó la herramienta ModelFinder, incluida en el paquete IQ-TREE2, para determinar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos adaptado a los datos. ModelFinder selecciona el modelo que mejor se ajusta a las características evolutivas de las secuencias, optimizando la precisión de los análisis. El modelo de sustitución identificado como el más adecuado fue GTR+F+I+G4, que incorpora la matriz generalizada de tasas de sustitución (GTR), frecuencias observadas (F), sitios invariantes (I) y una distribución gamma con cuatro categorías (G4) para representar la heterogeneidad de tasas entre sitios.

Con el modelo óptimo definido, se procedió a ejecutar nuevamente IQ-TREE2, empleando como entrada el archivo FASTA generado por MAFFT, con el propósito de construir un árbol filogenético de máxima verosimilitud. Este enfoque permite estimar la topología del árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos bajo el modelo evolutivo seleccionado, proporcionando una reconstrucción robusta de las relaciones evolutivas entre las secuencias analizadas.

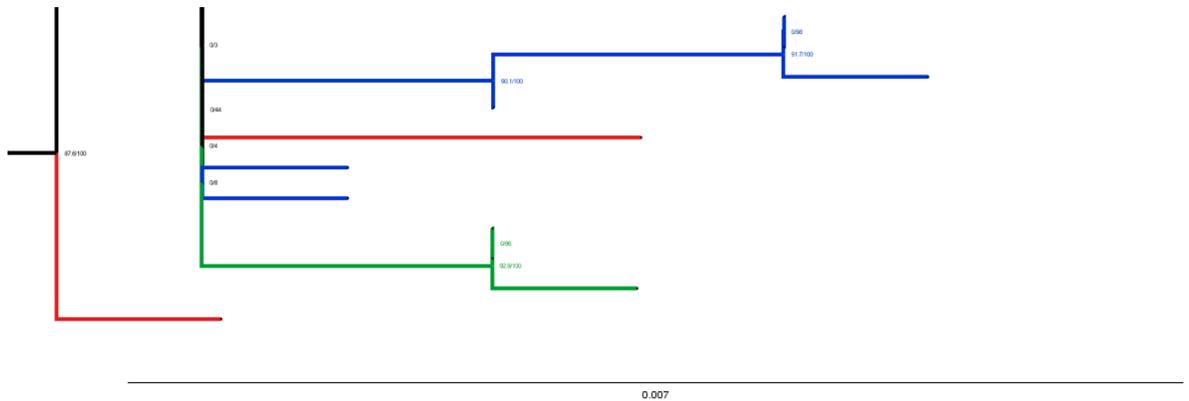
Una vez generado el archivo con extensión *.treefile*, se visualizó el árbol por medio de FigTree.



**Figura 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con IQ-TREE2 a partir de secuencias del gen G del VSR. Las muestras obtenidas en el estado de Nuevo León, México, durante la temporada invernal 2023–2024, se muestran en color rojo.**



**Figura 7. Sección del árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen G del VSR, generado mediante IQ-TREE2.** En esta porción del análisis se observa que una de las secuencias obtenidas en Nuevo León, México (en rojo), presenta una alta similitud genética con aislados procedentes de distintos estados de Estados Unidos. (en azul)



**Figura 8. Sección del árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen G del VSR, generado con IQ-TREE2.** Se muestra la relación entre aislados de diferentes regiones geográficas, incluyendo Estados Unidos (azul), Argentina (verde) y México. (Rojo).

En el análisis filogenético por máxima verosimilitud se observó que la secuencia PQ599900.1, obtenida en Nuevo León, México, se agrupa dentro de un clado junto con otras secuencias provenientes de Estados Unidos. Esta cercanía filogenética sugiere un origen común reciente entre estas cepas, lo cual podría indicar la circulación de un mismo linaje viral en distintas regiones de América del Norte. La presencia de secuencias estrechamente relacionadas en zonas geográficas distantes refuerza la hipótesis de un flujo viral transfronterizo, posiblemente asociado a la movilidad humana. Estos hallazgos son relevantes

para la vigilancia molecular del virus sincitial respiratorio, ya que evidencian la necesidad de monitorear constantemente la diversidad genética regional, particularmente ante la posible circulación de variantes que podrían tener implicaciones en la eficacia de vacunas basadas en clados extintos o divergentes.

En el segundo árbol filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud se observa que las dos secuencias provenientes de Nuevo León, México (PP790963.1 y PQ599899.1), no se agrupan dentro del mismo clado, lo que indica que pertenecen a linajes distintos del virus sincitial respiratorio. La secuencia PP790963.1 presenta una relación filogenética cercana con cepas reportadas en Argentina, lo que sugiere una posible conexión epidemiológica o circulación común de variantes entre América del Sur y el norte de México. Así como con muestras provenientes de Estados Unidos lo que sugiere la circulación de un linaje compartido entre el noreste de México y Estados Unidos.

### 13

## RESULTADOS OBJETIVO 2

Posteriormente, con el objetivo de determinar la señal temporal presente en los datos y evaluar la regularidad del reloj molecular dentro de la filogenia obtenida, se realizó un análisis utilizando el programa TempEst. TempEst (anteriormente conocido como Path-O-Gen) es una herramienta bioinformática diseñada específicamente para analizar si existe una correlación adecuada entre las fechas de muestreo de las secuencias y su divergencia genética acumulada a lo largo del tiempo. Esta evaluación es fundamental antes de proceder con análisis bayesianos de inferencia filogenética temporal, ya que permite verificar si las secuencias siguen un patrón de evolución que pueda modelarse con un reloj molecular.

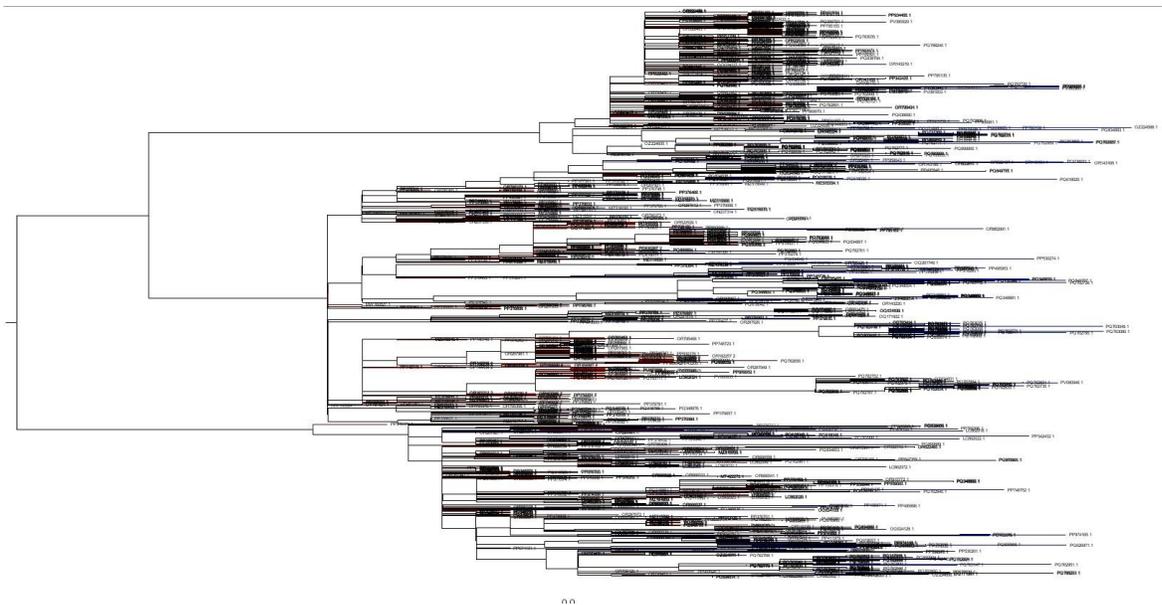
TempEst genera un árbol filogenético calibrado en el tiempo, donde no solo se representan las relaciones evolutivas entre las secuencias, sino también la dimensión temporal asociada a la divergencia genética. Para ello, se estima la

distancia genética desde la raíz del árbol hasta cada una de las hojas (secuencias) y se correlaciona con el año en que fue recolectada cada muestra. Si las secuencias evolucionan de manera relativamente constante en el tiempo, se espera una correlación lineal positiva entre estos dos parámetros.

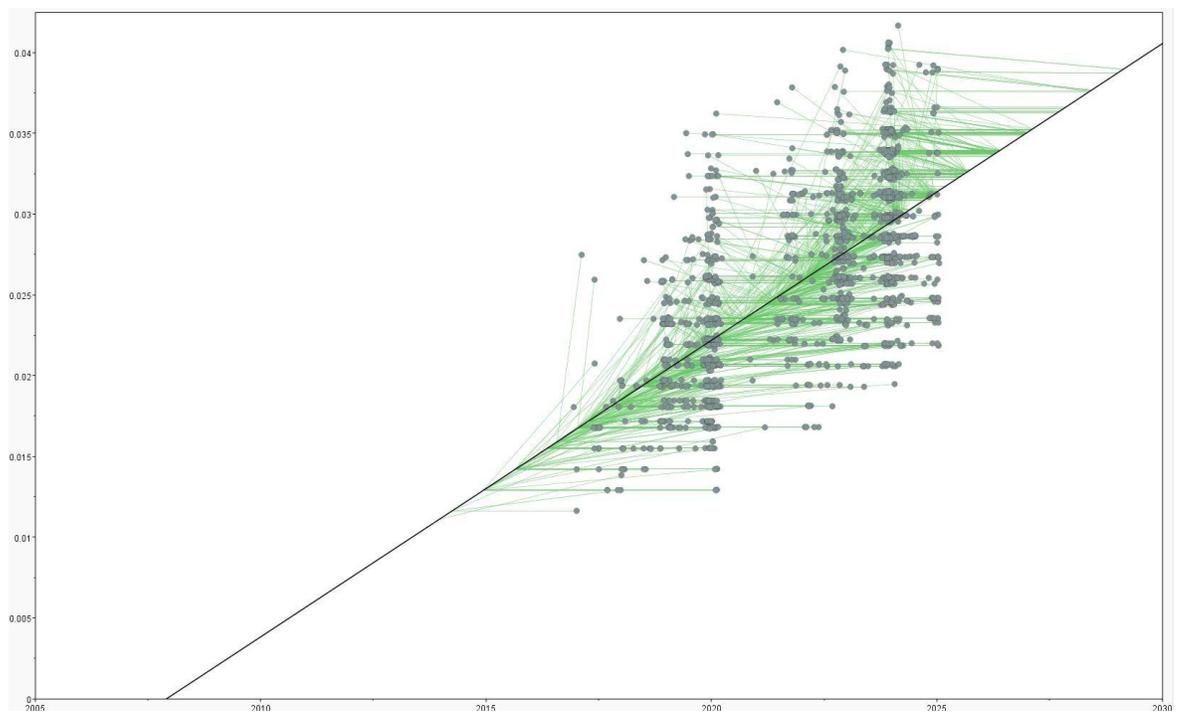
En este análisis, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Date Range: 8.104, lo cual indica que el intervalo de tiempo entre la muestra más antigua y la más reciente abarcó aproximadamente 8.1 años.
- Slope (rate): 1.835E-3, es decir, una tasa evolutiva aproximada de 0.001835 sustituciones por sitio por año, lo cual es coherente con lo observado en estudios anteriores del virus sincitial respiratorio.
- X-Intercept: 2007.9041, que representa el estimado del momento en el que pudo haber divergido la raíz del árbol en términos temporales, es decir, el posible origen común más reciente de las secuencias analizadas.
- Correlation coefficient: 0.658, que muestra una correlación moderadamente fuerte entre el tiempo y la distancia genética, sugiriendo que existe una señal temporal presente en los datos.
- R squared: 0.433, lo que significa que aproximadamente el 43.3% de la variabilidad genética puede explicarse por el tiempo de muestreo, lo cual es considerado aceptable en estudios virales.
- Residual mean square: 1.7003E-5, un valor que refleja el grado de dispersión de los datos alrededor de la línea de regresión, siendo relativamente bajo y, por lo tanto, indicando un ajuste razonable.

Estos resultados en conjunto indicaron que las secuencias presentaban una señal temporal suficiente para proseguir con análisis filogenéticos con calibración temporal, utilizando herramientas bayesianas como BEAST.

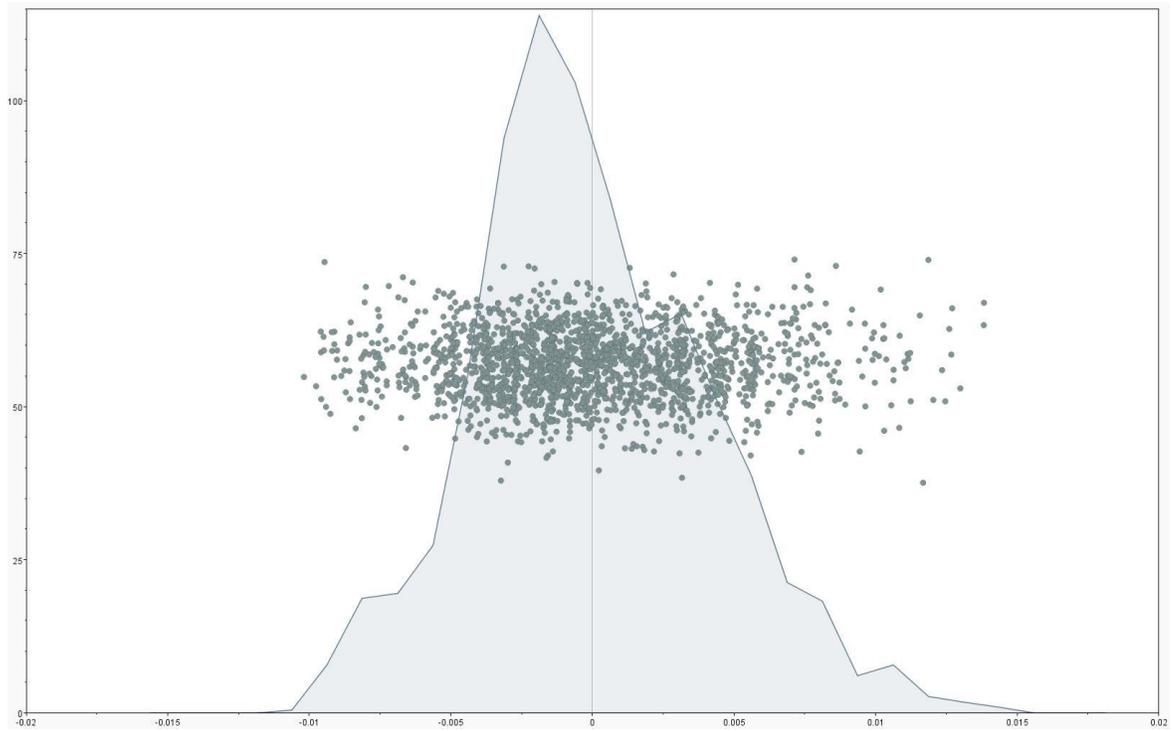


**Figura 9.** Árbol visualizado en el programa TempEst, posterior a la elección de *Best-fitting root*.

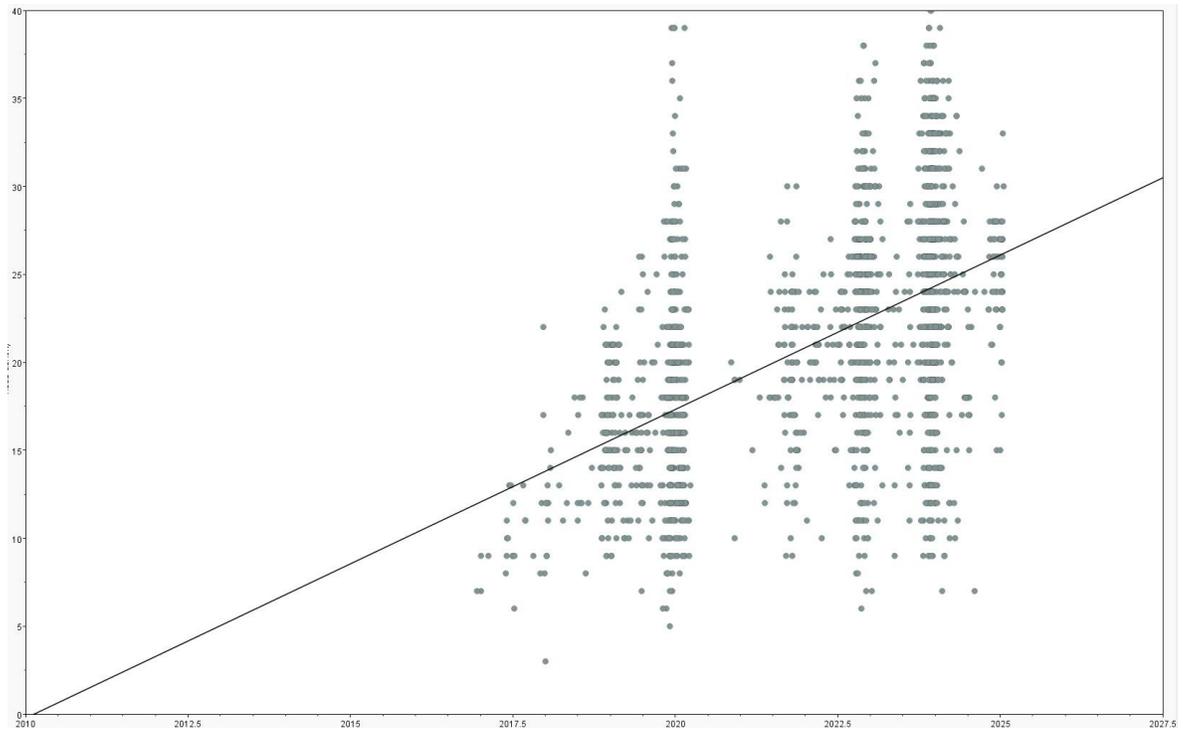


**Figura 10.** Gráfico de regresión raíz a punta (*root-to-tip*) generado en TempEst a partir del árbol filogenético inferido del VSR. En el eje X se representa el tiempo (año de muestreo) y en el eje Y la distancia genética desde la raíz. Cada punto representa una secuencia individual, mientras que las líneas verdes conectan las hojas del árbol con sus respectivas distancias. La línea negra indica la regresión lineal ajustada, utilizada para evaluar la señal temporal del conjunto de datos. La pendiente positiva sugiere una evolución molecular constante a lo largo del tiempo,

lo cual respalda la idoneidad del uso de modelos de reloj molecular en análisis filodinámicos posteriores.



**Figura 11. Distribución de residuos del análisis de regresión raíz a punta** realizado en TempEst para las secuencias del VSR. El gráfico muestra la dispersión de los residuos (diferencia entre la distancia genética observada y la esperada) a lo largo de la línea de regresión temporal. La nube de puntos indica una variabilidad moderada en torno a la media, mientras que la curva sombreada representa la densidad de frecuencia de los residuos. Esta distribución cercana a la simetría sugiere que no existen grandes desviaciones sistemáticas en el ajuste del modelo, lo que refuerza la validez de la señal temporal observada y la aplicabilidad de modelos de reloj molecular en el análisis filodinámico.



**Figura 12. Gráfico raíz-a-punta** generado en TempEst para las secuencias del VSR. En el eje X se representa el año de muestreo de cada secuencia, mientras que el eje Y muestra la distancia genética acumulada desde la raíz del árbol filogenético. La línea de regresión indica una tendencia lineal positiva entre la divergencia genética y el tiempo, lo que sugiere una señal temporal consistente en el conjunto de datos. Esta relación apoya el uso de un modelo de reloj molecular para el análisis filodinámico y datación de eventos evolutivos dentro de las secuencias analizadas.

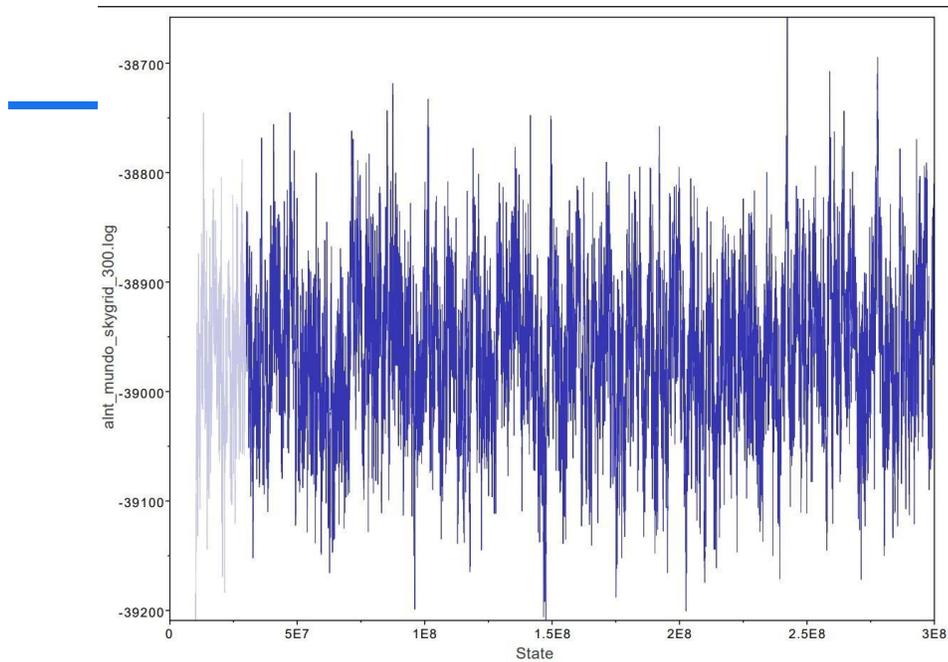
Posteriormente, para realizar la inferencia del árbol de máxima credibilidad de clado calibrado en tiempo y espacio, se utilizó el programa BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees), una herramienta ampliamente utilizada para inferir relaciones filogenéticas considerando tanto la evolución molecular como la información temporal de las secuencias analizadas. El objetivo principal de este análisis era obtener una reconstrucción evolutiva del VSR que no solo representara las relaciones genéticas entre los aislamientos virales, sino también cuándo y desde dónde se originaron y dispersaron en el tiempo y el espacio.

Para iniciar el análisis, primero se preparó el archivo de entrada en formato .xml utilizando BEAUti, la interfaz gráfica de BEAST. En esta etapa, se utilizaron los parámetros ya descritos previamente, donde se aplicó un modelo de

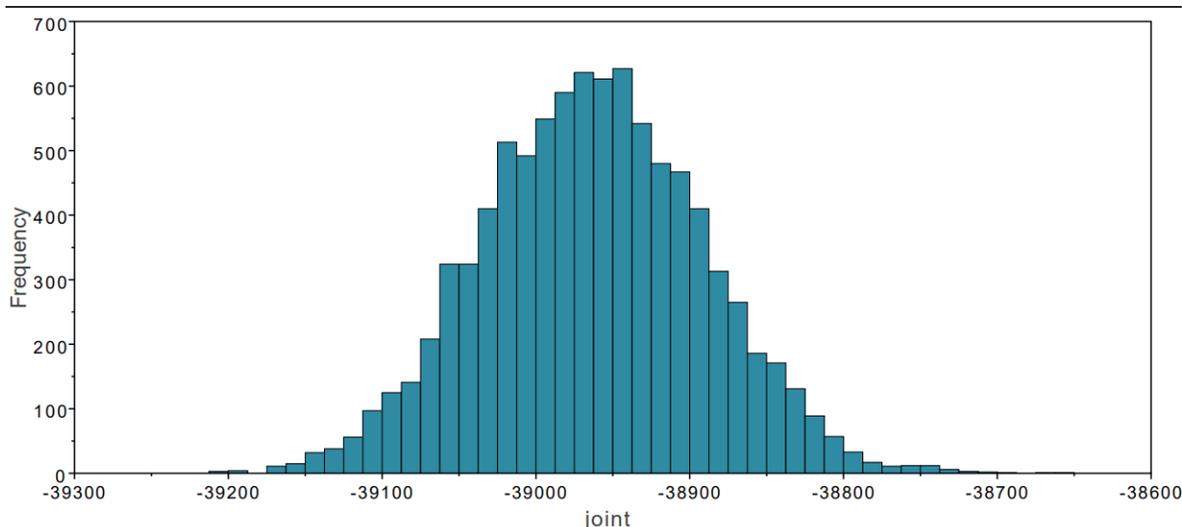
sustitución GTR con un modelo de heterogeneidad de sitios Gamma + Invariant sites, cuatro categorías gamma y un reloj molecular estricto. Además, para modelar la dinámica poblacional en el tiempo, se seleccionó como modelo de prior de árbol el Bayesian Skygrid, con 28 parámetros y un tiempo del último punto de transición configurado en 14, ya que se contaba con datos virales recolectados a lo largo de aproximadamente 14 años, lo cual permite realizar dos muestreos por año para un análisis más fino. Se incorporaron también los países de origen de cada una de las secuencias utilizadas, con el fin de reconstruir el componente espacial del árbol.

Una vez finalizada la configuración y generado el archivo .xml, se procedió a correr el análisis completo en BEAST.

Una vez completado el análisis, los resultados fueron visualizados utilizando el programa Tracer, una herramienta incluida en el paquete de BEAST diseñada para evaluar la convergencia y calidad del análisis bayesiano. Uno de los principales indicadores revisados en Tracer fue el ESS. Este valor representa cuántas muestras independientes efectivas se obtuvieron de la distribución posterior para cada parámetro estimado durante el análisis MCMC. Un ESS mayor a 200 se considera generalmente como indicador de una buena mezcla de la cadena de Markov, es decir, que los valores estimados son confiables y no están autocorrelacionados. En este estudio, se obtuvo un ESS >200 para todos los parámetros, lo cual aseguró que el análisis fue estadísticamente robusto y que los resultados obtenidos pueden interpretarse con confianza.



**Figura 13. Gráfico de convergencia obtenido en Tracer** para el análisis bayesiano de la reconstrucción filodinámica del VSR. En el eje X se muestra el número de iteraciones del muestreo (State) y en el eje Y los valores logaritmos de la verosimilitud (o el parámetro evaluado). El análisis mostró una distribución estable y bien mezclada, con un ESS > 200, lo cual indica una adecuada convergencia y muestreo eficiente del espacio posterior.



**Figura 14. Histograma de la distribución posterior del parámetro conjunto (joint) obtenido en Tracer.** El eje X representa los valores del parámetro conjunto estimado durante el muestreo bayesiano, mientras que el eje Y indica la frecuencia normalizada de dichos valores. La distribución muestra una forma aproximadamente normal, indicativa de una buena mezcla de la cadena de Markov. El valor del ESS fue mayor a 200, lo cual respalda la fiabilidad de las estimaciones posteriores y la adecuada convergencia del análisis.

Posteriormente, una vez confirmado que todos los parámetros analizados en Tracer presentaban un ESS >200, se procedió a realizar el anotado del árbol utilizando el programa TreeAnnotator, el cual forma parte del paquete de herramientas incluidas con BEAST. TreeAnnotator permite condensar la gran cantidad de árboles obtenidos a lo largo del análisis bayesiano en un solo árbol representativo, denominado árbol de máxima credibilidad de clado (Maximum Clade Credibility tree). Este árbol resume la topología más probable y asigna valores a los nodos con base en las frecuencias obtenidas durante la corrida MCMC.

Para este proceso se configuraron los siguientes parámetros: se estableció un Burnin de 30,000,000, lo cual representa el 10% del total de cadenas del análisis, con la finalidad de descartar las muestras iniciales que podrían no representar de manera adecuada la distribución posterior; se fijó un Posterior Probability Limit de 0.0, permitiendo así que se consideraran todos los nodos sin eliminar aquellos con baja probabilidad; como Target Tree Type se

seleccionó Maximum Clade Credibility Tree, lo que indica que se eligió la topología con mayor respaldo de nodos según la posterior; y finalmente, se optó por definir las Node Heights utilizando el criterio de median heights, es decir, tomando la mediana de las alturas de los nodos para representar de forma más estable la incertidumbre temporal.

Como resultado del proceso de anotación se obtuvo un archivo con extensión .tre, el cual contiene el árbol final anotado con fechas, relaciones filogenéticas, probabilidades a posteriori y la información geográfica de cada nodo, y posteriormente fue visualizado con el programa FigTree.

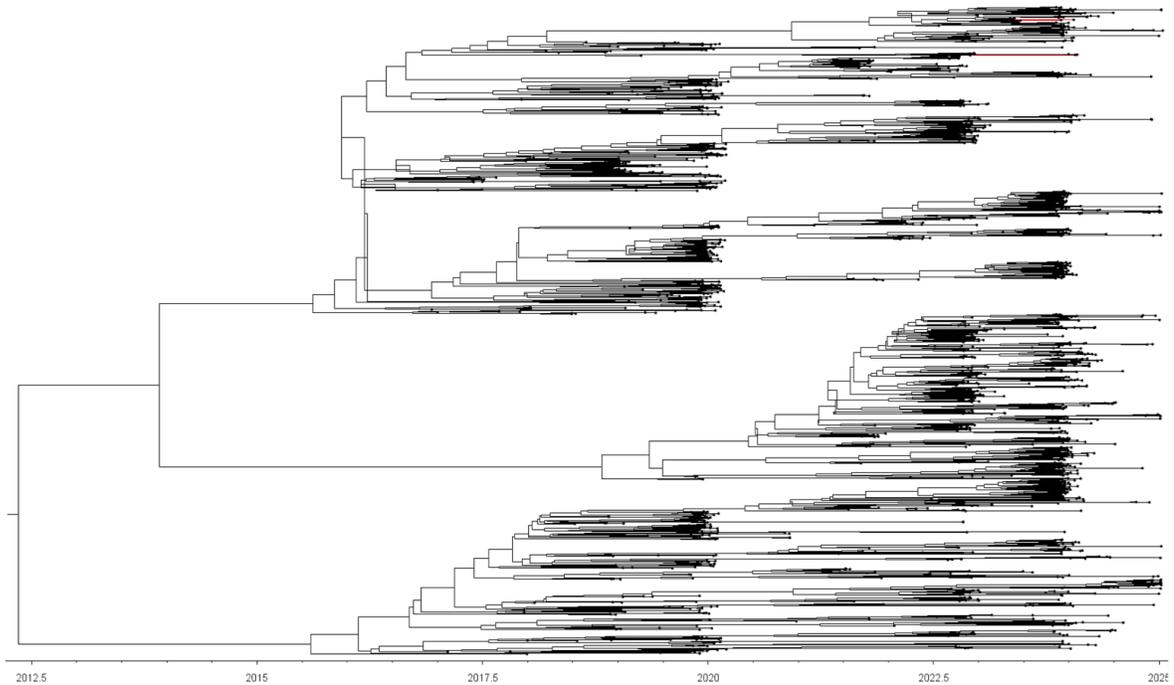
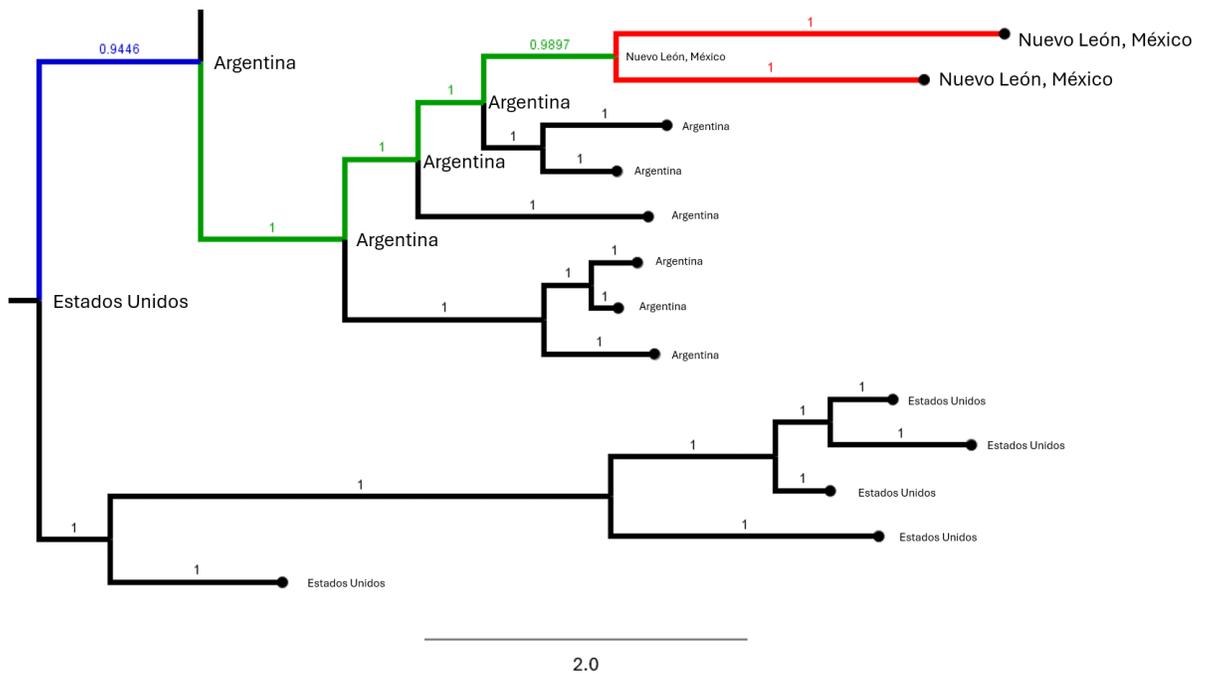
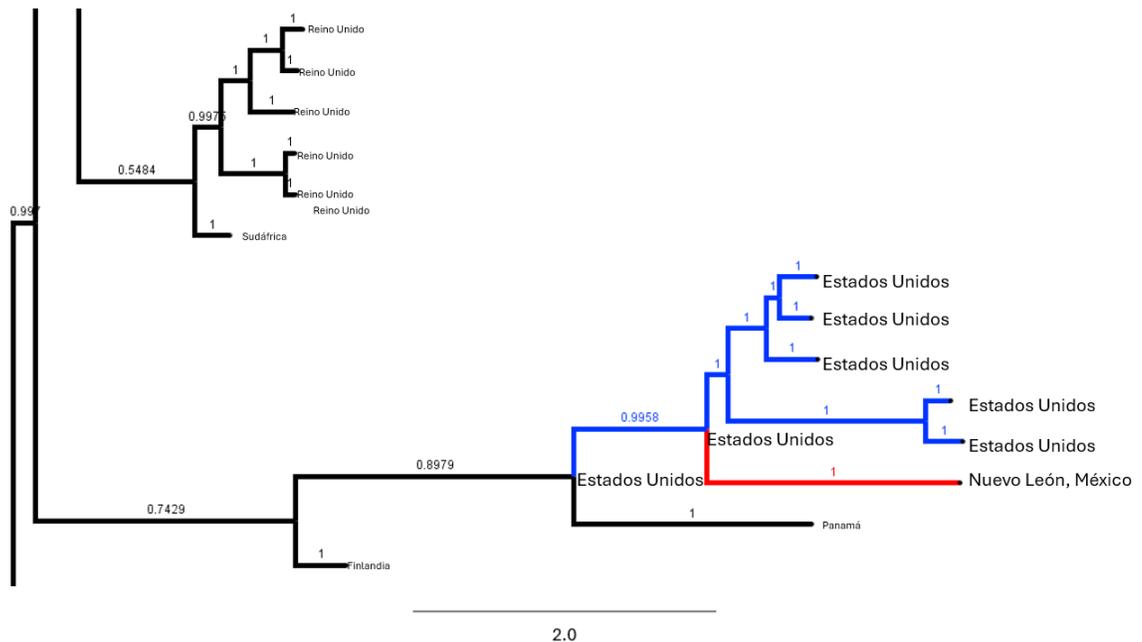


Figura 15. **Árbol filogenético obtenido mediante BEAST y visualizado en FigTree**, que muestra la extinción de varios clados después de 2020, seguida de una clara diversificación de los clados sobrevivientes en los años posteriores. Las secuencias de Nuevo León, México, están resaltadas en color rojo.



**Figura 16. Árbol de máxima credibilidad de clado generado en BEAST y visualizado en FigTree.** Dos muestras de Nuevo León, México (en rojo) forman un clado exclusivo, cuyo ancestro común inmediato corresponde a una secuencia aislada en Argentina (Verde). A su vez, el ancestro común más reciente de esta secuencia argentina proviene de una muestra de Estados Unidos (azul), lo que sugiere una posible ruta de dispersión viral desde EE. UU. hacia Sudamérica, y posteriormente hacia México. Este agrupamiento cuenta con una probabilidad posterior de 1, lo que indica un alto nivel de soporte estadístico.



**Figura 17. Árbol de máxima credibilidad de clado generado en BEAST y visualizado en FigTree.** Se observa que una muestra de Nuevo León, México (Identificada de color rojo) forma un clado independiente pero estrechamente relacionado con secuencias de Estados Unidos. El ancestro común más reciente de ambos clados corresponde a una secuencia proveniente de EUA, lo que sugiere un posible evento de introducción viral desde esa región. Este agrupamiento cuenta con una probabilidad posterior de 1, lo que indica un alto nivel de soporte estadístico.

En el árbol de máxima credibilidad de clado obtenido tras el análisis filodinámico, se observó de manera muy clara una gran extinción de diversos clados del VSR durante el año 2020. Esta desaparición coincide temporalmente con el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2 (COVID-19), lo cual sugiere una fuerte correlación entre ambos eventos. A partir del año 2021, se evidencia un resurgimiento con la supervivencia y diversificación de ciertos clados que persisten hasta el año 2025. Este patrón observado refleja un claro cuello de botella evolutivo durante el periodo más crítico de la pandemia de COVID-19, con una posterior expansión de los linajes supervivientes.

Al realizar un análisis más detallado, particularmente al observar la tasa de sustitución nucleotídica, se identificó que ésta no sufrió cambios significativos entre los clados que se extinguieron en 2020 y aquellos que sobrevivieron y se

diversificaron a partir de 2021. La tasa estimada para ambos grupos fue de aproximadamente  $2.57E-3$  sustituciones por sitio por año, lo que indica una estabilidad evolutiva relativamente constante a lo largo del tiempo, incluso a pesar del colapso temporal en la diversidad observado en el árbol.

Esta conservación en la tasa evolutiva sugiere que la extinción de múltiples clados no fue producto de una aceleración en el proceso de mutación del virus, como podría esperarse si hubiera habido presión selectiva intensa o evolución adaptativa abrupta. Por el contrario, lo más probable es que esta extinción masiva se deba a factores externos de origen epidemiológico, tales como la reorientación de los sistemas de vigilancia y diagnóstico hacia la detección de SARS-CoV-2, lo que redujo significativamente la capacidad para detectar otros virus respiratorios como el VSR. Asimismo, las estrictas medidas de contención poblacional, distanciamiento social, uso de cubrebocas y confinamiento implementadas para frenar la transmisión del COVID-19 también habrían impactado fuertemente la circulación del VSR, reduciendo las oportunidades de transmisión y causando la desaparición de varios linajes virales.

Otra posible explicación, es que el VSR haya seguido circulando de manera focal o subdetectada en regiones o poblaciones donde las medidas de contención no se implementaron de manera rigurosa o sostenida, lo que habría permitido la continuidad y posterior expansión de ciertos clados. También es posible, aunque menos probable dada la estabilidad en la tasa de sustitución que los clados supervivientes presentaran ligeras ventajas adaptativas en términos de transmisibilidad o evasión inmune que no se reflejan como un aumento en la tasa global de sustitución, pero que sí les otorgaron una mayor capacidad de persistencia en ambientes de baja circulación viral.

En conjunto, estos hallazgos ilustran cómo los eventos epidemiológicos a gran escala, como una pandemia global, pueden generar cuellos de botella virales, moldear la diversidad genética de virus respiratorios como el VSR, y afectar su dinámica evolutiva sin necesariamente alterar sus tasas de mutación.

En el árbol de máxima credibilidad de clado también se puede observar que dos de las tres muestras aisladas en el estado de Nuevo León forman un clado único y bien soportado, lo que proporciona evidencia clara de una circulación local del VSR en esta región durante la temporada invernal analizada. La formación de este clado exclusivo sugiere que dichas muestras comparten un ancestro común reciente y que el virus ha estado transmitiéndose dentro del estado de manera sostenida, posiblemente a través de cadenas locales de contagio.

Al trazar hacia atrás la filogenia de este clado, se observa que el ancestro común más cercano a este grupo de muestras de Nuevo León corresponde a un aislado originado en Argentina. Este linaje argentino, a su vez, muestra una diversificación hacia un clado local en Argentina y, paralelamente, da origen a la rama que posteriormente aparece en México, específicamente en Nuevo León. Este patrón indica que el virus fue importado de forma internacional, desde Argentina hacia México, muy probablemente a través del movimiento de personas o contactos internacionales, reflejando la interconexión global en la diseminación del VSR.

Finalmente, al continuar retrocediendo en el árbol filogenético, se identifica que la raíz ancestral del linaje argentino que dio lugar al clado de Nuevo León proviene de un aislado en los Estados Unidos. Esto sugiere que el linaje de VSR que actualmente circula en Nuevo León tiene un origen evolutivo que involucra al menos tres países en su trayectoria filogeográfica: Estados Unidos → Argentina → México (Nuevo León).

Finalmente, la tercera muestra aislada en el estado de Nuevo León no se agrupa dentro del clado formado por las otras dos muestras locales, sino que sigue una trayectoria filogenética distinta. En su caso, el ancestro común más cercano corresponde a un aislado proveniente de Estados Unidos, y al continuar hacia atrás en el árbol filogenético, se observa que su raíz también tiene origen en EUA, lo cual indica que esta muestra representa una introducción

independiente del virus sincitial respiratorio en la región, probablemente también a través de transmisión internacional directa desde territorio estadounidense.

Cabe mencionar que el soporte estadístico de todos estos clados, medido como probabilidad posterior, es superior a 0.95, lo cual indica un alto grado de confianza en la resolución de estas relaciones filogenéticas.

Posterior a este análisis filogenético, y con la finalidad de confirmar las observaciones obtenidas en cuanto a los patrones de transmisión y la posible importación internacional del virus sincitial respiratorio (VSR) hacia el estado de Nuevo León, se utilizó la plataforma Nextstrain. Esta es una herramienta bioinformática interactiva y de código abierto que permite la visualización en tiempo real de la evolución genética de agentes infecciosos, como virus y bacterias, integrando análisis filogenéticos, metadatos epidemiológicos y representaciones geoespaciales. Nextstrain ofrece una interfaz dinámica que facilita la exploración de árboles filogenéticos, mapas de dispersión global y líneas de tiempo, todo ello basado en datos genómicos actualizados y metadatos recopilados de diversas fuentes.

A través de la base de datos disponible en Nextstrain, se exploraron las trayectorias de transmisión geográfica del VSR. Al visualizar el mapa interactivo proporcionado por la plataforma, fue posible observar de manera clara una conexión directa entre los aislamientos de Estados Unidos, México y Argentina, en correspondencia con lo observado previamente en el árbol filogenético generado mediante BEAST. Esta visualización confirmó de manera complementaria que, efectivamente, las secuencias obtenidas en el estado de Nuevo León tienen un vínculo filogenético cercano con aislamientos argentinos y estadounidenses, lo cual respalda la hipótesis de una introducción internacional del virus hacia México, reforzando así la validez de los resultados obtenidos a través del análisis temporal y espacial llevado a cabo con herramientas de filogenia bayesiana.



**Figura 18. Mapa geográfico generado en Nextstrain que muestra las líneas de transmisión del VSR en América.** Se observa un patrón de circulación viral desde Estados Unidos hacia Argentina, seguido de una introducción posterior a México, lo que sugiere rutas de diseminación transcontinentales

14

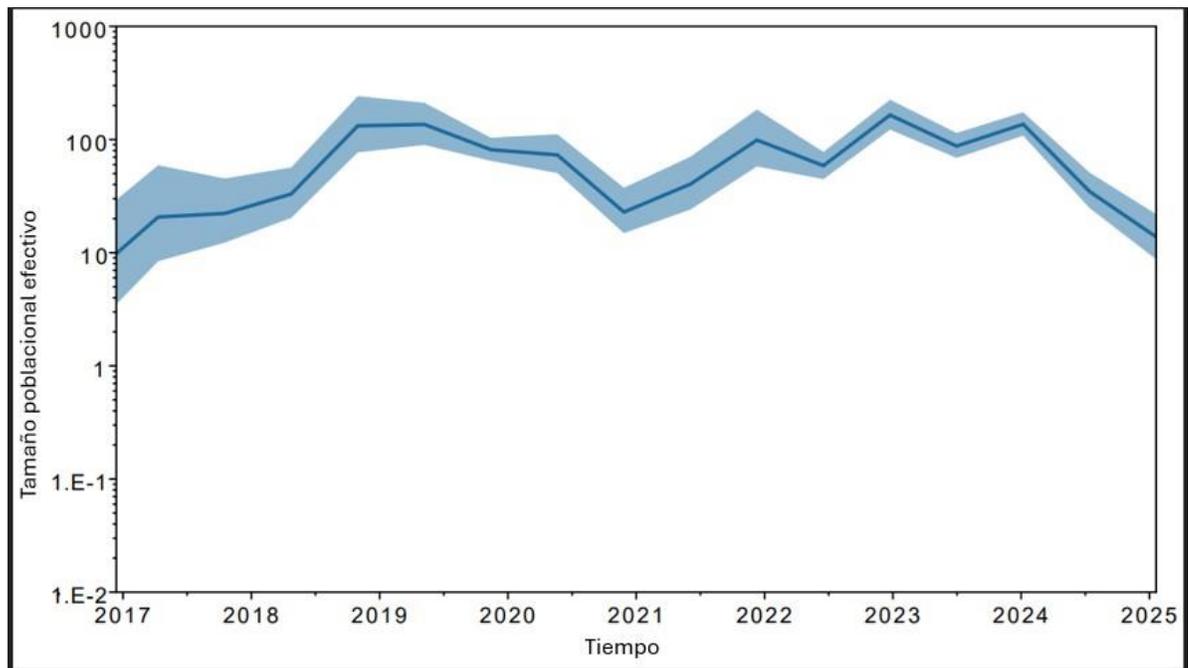
### RESULTADOS OBJETIVO 3

Para el siguiente objetivo, que consistió en analizar la dinámica poblacional del VSR, se aprovechó el archivo .xml previamente generado mediante BEAUti, en el cual ya se había configurado el modelo de Bayesian Skygrid como *tree prior*. Este modelo permite estimar los cambios en el tamaño poblacional efectivo del virus a lo largo del tiempo, proporcionando una representación flexible y no paramétrica de su historia demográfica.

Para esta configuración, se estableció una resolución temporal de dos intervalos por año (es decir, una medición cada 6 meses), cubriendo un total de 8 años, lo cual resultó en 16 intervalos de estimación. Esta escala temporal fue seleccionada para poder capturar con suficiente resolución los cambios

poblacionales que hayan ocurrido antes, durante y después de la pandemia por COVID-19, sin perder la estabilidad estadística del modelo.

Con este archivo y los resultados de la corrida en BEAST, se procedió a realizar la reconstrucción demográfica en el programa TRACER, el cual forma parte del paquete de herramientas complementarias de BEAST. En la sección de "Analysis" se utilizó la opción de "Skygrid Reconstruction", ingresando como parámetro clave la fecha decimal de la muestra más reciente (2025.0520), y ajustando manualmente el eje X del gráfico para que abarque el intervalo de tiempo desde 2016.9480 (correspondiente a la muestra más antigua) hasta 2025.0520.



**Figura 19. Análisis filodinámico del VSR utilizando el modelo Bayesian SkyGrid en BEAST,** mostrando cambios en el tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) a lo largo del tiempo (escala logarítmica en el eje Y). El eje X representa años (2017–2025), con una disminución notable en la diversidad genética hacia 2020–2021, seguida de una recuperación parcial y posterior comportamiento estable compatible con cambios estacionales del virus.

En la Figura, se observa un marcado aumento en la diversidad genética efectiva del VSR desde finales de 2016 hasta alcanzar un primer pico en 2019,

lo cual podría estar relacionado con la circulación de múltiples linajes virales o un aumento en la tasa de transmisión. Posteriormente, entre 2020 y 2021, se evidencia una caída en el tamaño poblacional efectivo, coincidente con el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2, durante la cual se documentó una reducción generalizada en la circulación de virus respiratorios estacionales, incluido el VSR. Este descenso sugiere un posible cuello de botella poblacional, probablemente inducido por las medidas de mitigación de la COVID-19, como el confinamiento, el uso de mascarillas y la suspensión de actividades escolares.

A partir de 2021, se aprecia una recuperación progresiva de la diversidad genética efectiva, alcanzando un segundo pico en 2023, lo cual concuerda con los reportes de reemergencia del VSR en diversos países tras el levantamiento de las restricciones sanitarias. Esta tendencia sugiere una nueva expansión poblacional del virus, posiblemente favorecida por la acumulación de individuos susceptibles durante el periodo de baja circulación.

Sin embargo, a partir de mediados de 2024, el modelo muestra una nueva caída en el tamaño poblacional efectivo del VSR. Esta disminución puede interpretarse como una señal de presión selectiva reciente, posiblemente atribuible a la introducción de intervenciones como programas de vacunación o el uso extendido de profilaxis con anticuerpos monoclonales. Alternativamente, también podría reflejar la dominancia de un número reducido de variantes virales, resultado de un proceso de sustitución de linajes con menor diversidad intracclado.

Cabe destacar que los intervalos de credibilidad se amplían hacia los extremos del eje temporal, lo cual es esperable debido a la menor densidad de información genética en esas regiones.

## RESULTADOS OBJETIVO 4

Para el siguiente objetivo, que consistió en identificar potenciales adaptaciones evolutivas del VSR, se aprovechó el análisis de la calidad del ensamblado de las secuencias de genoma completo obtenidas en el laboratorio. Estas secuencias fueron utilizadas, ya que abarcan de manera íntegra el gen que codifica para la proteína F, la cual es el principal blanco de los anticuerpos monoclonales (mAbs) y de las vacunas actualmente comercializadas para la prevención de la infección por VSR.

El análisis se realizó utilizando la plataforma Nextclade, una herramienta bioinformática ampliamente utilizada en estudios de vigilancia genómica viral. Nextclade no solo permite evaluar la calidad de las secuencias y asignar clados filogenéticos, sino que también genera un reporte detallado de mutaciones (incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones) en comparación con una secuencia consenso de referencia, que en este caso fue A/England/397/2017.

Posterior a la obtención del reporte de mutaciones, se procedió a realizar una búsqueda intencionada de aquellas mutaciones previamente reportadas en la literatura científica como asociadas a resistencia a anticuerpos monoclonales y vacunas.

En el reporte de mutaciones generado por la plataforma Nextclade, se observó que las tres secuencias obtenidas en Nuevo León no contenían mutaciones previamente reportadas en la literatura como asociadas a resistencia a anticuerpos monoclonales o vacunas. Sin embargo, se identificaron un conjunto de mutaciones compartidas entre las tres secuencias, lo cual podría indicar un origen común o una circulación local de una variante particular del VSR en la región.

Las mutaciones compartidas fueron las siguientes:

| Gen | Mutación |
|-----|----------|
| G   | L142S    |
| G   | E224V    |
| G   | L298P    |
| G   | T320A    |
| L   | N143D    |
| L   | T179S    |
| L   | I1653V   |
| L   | K1661N   |
| L   | E1725G   |
| M   | M43I     |

**Tabla 11.** Mutaciones encontradas que son compartidas entre las tres secuencias mexicanas y el gen correspondiente en el que se encuentran.

## DISCUSIÓN

El análisis filogenético y evolutivo del VSR realizado en esta tesis proporciona una visión amplia de la dinámica de transmisión, diversidad genética y evolución reciente del virus, con especial énfasis en la circulación de variantes en el estado de Nuevo León durante la temporada invernal de 2023-2024. Los datos obtenidos permiten reflexionar sobre el impacto de eventos epidemiológicos globales, como la pandemia por COVID-19, así como sobre la necesidad de una vigilancia genómica sostenida del VSR, especialmente ante la reciente introducción de terapias inmunoprevenibles como los anticuerpos monoclonales y vacunas dirigidas contra la proteína F.

En primer lugar, el alineamiento de secuencias mediante MAFFT permitió estandarizar los fragmentos genéticos al tamaño correspondiente a la proteína G, optimizando así la calidad del análisis filogenético posterior. La selección del modelo de sustitución GTR+F+I+G4 mediante IQ-TREE2, y la posterior inferencia de árboles de máxima verosimilitud, proporcionaron una base sólida para explorar las relaciones evolutivas entre las cepas analizadas. El análisis temporal mediante TempEst reveló una correlación moderada ( $R^2 = 0.433$ ) entre la divergencia genética y el tiempo, con una tasa de sustitución de  $1.835E-3$ , lo cual sugiere una señal temporal aceptable para inferencias calibradas en el tiempo. Este valor es consistente con reportes previos para VSR<sup>12</sup>, reafirmando la confiabilidad del análisis.

Uno de los hallazgos más llamativos fue la clara señal de extinción de múltiples clados durante el año 2020, coincidente con la pandemia por SARS-CoV-2. Esta reducción en la diversidad genética no se asoció con un cambio significativo en la tasa de sustitución ( $2.57E-3$ ), lo cual sugiere que la extinción de clados no fue resultado de un cambio evolutivo acelerado del virus, sino más probablemente producto de factores externos<sup>61,63</sup>. Dos hipótesis emergen: 1. una menor vigilancia y notificación del VSR durante los años pico de COVID-19 debido a la focalización de recursos diagnósticos en SARS-CoV-2, y 2. la eficacia

de las medidas no farmacológicas implementadas para COVID-19 (como el distanciamiento social y uso de mascarillas) en reducir la transmisión de otros virus respiratorios como el VSR<sup>61-65</sup>.

Tras la relajación de estas medidas, varios países experimentaron brotes atípicos, fuera de temporada y con intensidades inusuales, afectando a grupos etarios más amplios, incluyendo niños mayores sin inmunidad previa<sup>66-70</sup>. Esta alteración de la estacionalidad y los patrones epidemiológicos del VSR también fue documentada en América Latina y México, donde se observó un aumento en la proporción de hospitalizaciones en edades mayores a las tradicionalmente afectadas<sup>61,67,71</sup>

En términos de filodinámica, el análisis en BEAST utilizando un modelo Bayesian Skygrid con mediciones cada seis meses durante los últimos ocho años permitió visualizar las fluctuaciones en el tamaño poblacional efectivo del virus. Los resultados obtenidos en TRACER evidenciaron un cuello de botella en 2020, seguido por un aumento paulatino en el tamaño poblacional del VSR a partir de 2021, apoyando nuevamente la hipótesis de un resurgimiento post-pandémico<sup>66,67,72</sup>

La vigilancia genómica en distintas regiones muestra que, tras la pandemia, no surgieron variantes radicalmente nuevas, sino una reemergencia de genotipos previamente circulantes, como ON1 (RSV-A) y BA-CC (RSV-B), con acumulación de mutaciones en regiones antigénicas relevantes como las proteínas G y F<sup>68-70,73,74</sup>

En cuanto a la circulación geográfica, el árbol de máxima credibilidad generado por TreeAnnotator mostró que dos de las tres muestras obtenidas en Nuevo León formaban un clado único, con alto soporte estadístico (>0.95), lo que respalda una circulación local del virus en la región. Este clado compartía un ancestro común con un aislado previo de Argentina, sugiriendo un evento de importación internacional, y dicho linaje argentino se remontaba filogenéticamente a un linaje estadounidense, marcando una posible ruta de transmisión EUA → Argentina → México. La tercera muestra de Nuevo León,

aunque no pertenecía al mismo clado, también compartía un ancestro cercano con un aislado de EUA, lo que refuerza el papel de este país como fuente recurrente de variantes virales. Estos hallazgos fueron respaldados de forma independiente mediante la plataforma Nextstrain, la cual permite visualizar en un mapa global las rutas evolutivas y geográficas del virus, confirmando la conexión filogeográfica entre EUA, México y Argentina.

El análisis de mutaciones a partir de los genomas completos ensamblados permitió explorar la posibilidad de adaptaciones evolutivas recientes. Aunque no se detectaron mutaciones en la proteína F que estuvieran asociadas en la literatura con resistencia a vacunas o anticuerpos monoclonales, se identificaron varias mutaciones compartidas en las proteínas G, L y M entre las tres muestras de Nuevo León: L142S, E224V, L298P y T320A en la G; N143D, T179S, I1653V, K1661N y E1725G en la L; y M43I en la M. La presencia compartida de estas mutaciones sugiere un linaje circulante común, y aunque su relevancia funcional aún no está descrita, podrían representar adaptaciones locales o mutaciones neutras que se han fijado por deriva genética<sup>69,74,77</sup>. Estudios recientes han comenzado a esclarecer la relación entre estas mutaciones y la funcionalidad de la polimerasa viral, así como su interacción con la proteína de matriz, lo cual podría abrir nuevas vías terapéuticas<sup>73,77,78</sup>.

En cuanto a la prevención, el uso de anticuerpos monoclonales de larga duración como nirsevimab ha demostrado una eficacia significativa en reducir las hospitalizaciones por VSR en lactantes, incluso en un contexto de cambios post-pandemia. La vacunación materna también ha mostrado resultados alentadores, y ambas estrategias han sido recientemente implementadas en algunos países como EE. UU.<sup>61,79–81</sup>. Sin embargo, persisten desafíos importantes en América Latina, como la desigualdad en el acceso a diagnóstico molecular, terapias y nuevas herramientas preventivas<sup>61,71</sup>.

Desde el punto de vista metodológico, diversos estudios han documentado la adaptación de protocolos como Illumina CovidSeq™ y PCR multiplex para la vigilancia genómica eficiente del VSR, incluso en contextos con baja carga viral,

facilitando la secuenciación y análisis en tiempo real<sup>69,70,76,82</sup>. Estas innovaciones permiten una respuesta más rápida ante brotes y una mejor caracterización de la diversidad viral circulante.

En conjunto, los resultados de esta tesis no solo permiten contextualizar la evolución del VSR en un periodo post-pandémico, sino que también refuerzan la necesidad de mantener una vigilancia molecular activa que incorpore herramientas bioinformáticas robustas, filodinámica calibrada en el tiempo y análisis funcional de variantes. Esto cobra aún mayor relevancia ante la reciente disponibilidad de vacunas y terapias inmunológicas específicas, las cuales podrían ejercer una presión selectiva significativa en las poblaciones virales circulantes.

## CONCLUSIÓN

El virus sincitial respiratorio en el noreste de México mostró una alta diversidad genética con múltiples introducciones transcontinentales, destacando una posible ruta de transmisión EUA → Argentina → México. Durante el periodo 2020–2021, se identificó un cuello de botella genético asociado a la pandemia de COVID-19, seguido por una recuperación parcial de la diversidad viral. Esta dinámica estuvo más influenciada por factores sociales y epidemiológicos que por presión evolutiva, ya que no se observaron cambios en la tasa de sustitución ni mutaciones asociadas a resistencia a vacunas o terapias inmunoprevenibles.

Se identificaron mutaciones compartidas en proteínas G, L y M entre los aislamientos locales, que podrían representar adaptaciones locales o eventos de deriva genética, aunque su impacto funcional aún no ha sido descrito. Asimismo, se detectó un clado local con alto soporte estadístico, lo que evidencia circulación autóctona del VSR en la región.

El uso de secuenciación de tercera generación y herramientas bioinformáticas permitió un análisis robusto, mientras que el enfoque filodinámico reveló fluctuaciones poblacionales concordantes con eventos epidemiológicos recientes. En conjunto, estos hallazgos reafirman la importancia de una vigilancia genómica sostenida, especialmente ante la introducción de nuevas estrategias preventivas como los anticuerpos monoclonales y las vacunas dirigidas contra la proteína F.

## REFERENCIAS

1. RSV virus expected to add pressure on hospitals in many EU/EEA countries this season. (2022, 23 noviembre). European Centre For Disease Prevention And Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/rsv-virus-expected-add-pressure-hospitals-many-eueea-countries-season#:~:text=Worldwide%2C%20the%20virus%20is%20estimated,in%20children%20under%20five%20years>.
2. De Salud, S. (s. f.). Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Influenza, COVID-19 y otros virus respiratorios 2024. gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-covid-19-y-otros-virus-respiratorios-2024>
3. RSV Surveillance and Research <https://www.cdc.gov/rsv/research/index.html> | CDC. (s. f.).
4. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jan;30(1):277-319. doi: 10.1128/CMR.00010-16. PMID: 27903593; PMCID: PMC5217795.
5. Jha A, Jarvis H, Fraser C, et al. Respiratory Syncytial Virus. In: Hui DS, Rossi GA, Johnston SL, editors. SARS, MERS and other Viral Lung Infections. Sheffield (UK): European Respiratory Society; 2016 Jun 1. Chapter 5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442240/>
6. "Genus: Orthopneumovirus – Pneumoviridae – Negative-sense RNA Viruses". International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Archived from the original on 3 June 2021. Retrieved 29 October 2020.
7. Ramaekers K, Rector A, Cuypers L, Lemey P, Keyaerts E, Van Ranst M. Towards a unified classification for human respiratory syncytial virus

- genotypes. *Virus Evol.* 2020 Jul 24;6(2):veaa052. doi: 10.1093/ve/veaa052. PMID: 33072402; PMCID: PMC7552823.
8. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jan;13(1):1-15, table of contents. doi: 10.1128/CMR.13.1.1. PMID: 10627488; PMCID: PMC88930.
  9. Zhao X, Wang C, Jiang H, Zhang H, Fang F, Chen M, Yuan Z, Teng Z, Liu J, Zhang X. Analysis of circulating respiratory syncytial virus A strains in Shanghai, China identified a new and increasingly prevalent lineage within the dominant ON1 genotype. *Front Microbiol.* 2022 Aug 11;13:966235. doi: 10.3389/fmicb.2022.966235. PMID: 36033866; PMCID: PMC9403419.
  10. Regassa BT, Gebrewold LA, Mekuria WT, Kassa NA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in children with acute respiratory illnesses in Africa: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health.* 2023 Jan 14;13:04001. doi: 10.7189/jogh.13.04001. PMID: 36637855; PMCID: PMC9840062.
  11. Collins, P.L., Fearn, R., Graham, B.S. (2013). Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. In: Anderson, L., Graham, B. (eds) *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 372. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1)
  12. u, JM., Fu, YH., Peng, XL. et al. Genetic diversity and molecular evolution of human respiratory syncytial virus A and B. *Sci Rep* 11, 12941 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92435-1>
  13. Cantú-Flores, K., Rivera-Alfaro, G., Muñoz-Escalante, J. C., & Noyola, D. E. (2022). Global distribution of respiratory syncytial virus A and B infections: a systematic review. *Pathogens and Global Health*, 116(7), 398–409. <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2038053>
  14. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R (July 2006). "Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis". *The Journal of*

General Virology. 87 (Pt 7): 1805–1821. doi:10.1099/vir.0.81786-0. PMID 16760383

15. Drysdale SB, Green CA, Sande CJ. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. *Ther Adv Infect Dis*. 2016 Apr;3(2):63-71. doi: 10.1177/2049936116630243. Epub 2016 Feb 10. PMID: 27034777; PMCID: PMC4784570.
16. Wang CC, Prather KA, Sznitman J, Jimenez JL, Lakdawala SS, Tufekci Z, Marr LC. Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*. 2021 Aug 27;373(6558):eabd9149. doi: 10.1126/science.abd9149. PMID: 34446582; PMCID: PMC8721651.
17. RSV transmission. (2023, 25 septiembre). Centers For Disease Control And Prevention. <https://www.cdc.gov/rsv/about/transmission.html>
18. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Dec;45(3):331-79. doi: 10.1007/s12016-013-8368-9. PMID: 23575961; PMCID: PMC7090643.
19. Smith, D. K., Seales, S., & Budzik, C. (2017, 15 enero). Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2017/0115/p94.html> AAFP.
20. Friedman JN, Rieder MJ, Walton JM; Canadian Paediatric Society, Acute Care Committee, Drug Therapy and Hazardous Substances Committee. Bronchiolitis: Recommendations for diagnosis, monitoring and management of children one to 24 months of age. *Paediatr Child Health*. 2014 Nov;19(9):485-98. doi: 10.1093/pch/19.9.485. PMID: 25414585; PMCID: PMC4235450.
21. Wang, Y., Zhao, Y., Bolla, A. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* 39, 1348–1365 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
22. Comas, I., Cancino-Muñoz, I., Mariner-Llicer, C., Goig, G. A., Ruiz-Hueso, P., FrancésCuesta, C., García-González, N., & González-Candelas, F. (2020). Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el

diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2020.02.006> 38, 32–38.

23. Ralston, S. L., Lieberthal, A. S., Meissner, H. C., Alverson, B. K., Baley, J. E., Gadomski, A. M., Johnson, D. W., Light, M. J., Maraga, N. F., Mendonca, E. A., Phelan, K. J., Zorc, J. J., Stanko-Lopp, D., Brown, M. A., Nathanson, I., Rosenblum, E., Sayles, S., Hernandez-Cancio, S., Ralston, S. L., . . . Hernandez-Cancio, S. (2014). Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *Pediatrics*, 134(5), e1474 e1502. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-2742>
24. Ventre K, Randolph A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD000181. DOI: 10.1002/14651858.CD000181.pub3. Accessed 21 May 2024.
25. Andabaka T, Nickerson JW, Rojas-Reyes MX, Rueda JD, Bacic Vrca V, Barsic B. Monoclonal antibody for reducing the risk of respiratory syncytial virus infection in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 4. Art. No.: CD006602. DOI: 10.1002/14651858.CD006602.pub4. Accessed 28 May 2024.
26. Hammitt, L. L., Dagan, R., Yuan, Y., Cots, M. B., Bosheva, M., Madhi, S. A., Muller, W. J., Zar, H. J., Brooks, D., Grenham, A., Hamrén, U. W., Mankad, V. S., Ren, P., Takas, T., Abram, M. E., Leach, A., Griffin, M. P., & Villafana, T. (2022). Nirsevimab for prevention of RSV in healthy Late-Preterm and Term infants. *New England Journal of Medicine*, 386(9), 837–846. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2110275>
27. Zhu Q, McLellan JS, Kallewaard NL, Ulbrandt ND, Palaszynski S, Zhang J, Moldt B, Khan A, Svabek C, McAuliffe JM, Wrapp D, Patel NK, Cook KE, Richter BWM, Ryan PC, Yuan AQ, Suzich JA. A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. *Sci Transl Med*. 2017 May 3;9(388):eaaj1928. doi: 10.1126/scitranslmed.aaj1928. PMID: 28469033.

28. Phuah JY, Maas BM, Tang A, Zhang Y, Caro L, Railkar RA, Swanson MD, Cao Y, Li H, Roadcap B, Catchpole AP, Aliprantis AO, Vora KA. Quantification of clesrovimab, an investigational, half-life extended, anti-respiratory syncytial virus protein F human monoclonal antibody in the nasal epithelial lining fluid of healthy adults. *Biomed Pharmacother.* 2023 Dec 31;169:115851. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115851. Epub 2023 Nov 14. PMID: 37976891.
29. Zar HJ, Simoes E, Madhi S, Ramilo O, Senders S, Shepard JS, Laoprasopwattana K, Piedrahita J, Novoa Pizarro JM, Vargas SL, Dionne M, Jackowska T, Liu E, Ishihara Y, Ikeda K, Zhang Y, Railkar RA, Lutkiewicz J, Lee AW, Guerra A, Sinha A. 166. A Phase 2b/3 Study to Evaluate the Efficacy and Safety of an Investigational Respiratory Syncytial Virus (RSV) Antibody, Clesrovimab, in Healthy Preterm and Full-Term Infants. *Open Forum Infect Dis.* 2025 Jan 29;12(Suppl 1):ofae631.003. doi: 10.1093/ofid/ofae631.003. PMCID: PMC11777356.
30. Beigel JH, Nam HH, Adams PL, Krafft A, Ince WL, El-Kamary SS, Sims AC. Advances in respiratory virus therapeutics - A meeting report from the 6th isirv Antiviral Group conference. *Antiviral Res.* 2019 Jul;167:45-67. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.006. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30974127; PMCID: PMC7132446.
31. DailyMed - AREXVY- respiratory syncytial virus vaccine recombinant, adjuvanted kit. (s. f.). <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=1e50f275-002e413f-a840-66ee3cb3740c>
32. Michelle C. Crank et al. ,A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in 509(2019).DOI:10.1126/science.aav9033 humans.Science365,505
33. Office of the Commissioner. (2023, 3 mayo). FDA approves first Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccine. U.S. Food And Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-respiratory-syncytial-virus-rsv-vaccine>

34. DailyMed - ABRYSSVO- respiratory syncytial virus vaccine kit. (s. f.).  
<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=be18292e-b1a24815-a0ed-003efaa6bea3>
35. U.S. Food and Drug Administration (18 May 2023). "Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee May 18, 2023 Meeting Briefing Document" (PDF). Food and Drug Administration.
36. Walsh EE, Pérez Marc G, Zareba AM, Falsey AR, Jiang Q, Patton M, et al. (April 2023). "Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults". *The New England Journal of Medicine*. 388 (16): 1465–1477. doi:10.1056/NEJMoa2213836
37. MRESVIA | European Medicines Agency (EMA). (2025, May 5). European Medicines Agency (EMA).  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mresvia>
38. Walsh EE, Pérez Marc G, Zareba AM, Falsey AR, Jiang Q, Patton M, Polack FP, Llapur C, Doreski PA, Ilangovan K, Rämets M, Fukushima Y, Hussen N, Bont LJ, Cardona J, DeHaan E, Castillo Villa G, Ingilizova M, Eiras D, Mikati T, Shah RN, Schneider K, Cooper D, Koury K, Lino MM, Anderson AS, Jansen KU, Swanson KA, Gurtman A, Gruber WC, Schmoele-Thoma B; RENOIR Clinical Trial Group. Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med*. 2023 Apr 20;388(16):1465-1477. doi: 10.1056/NEJMoa2213836. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37018468.
39. Research, C. F. B. E. A. (2024, December 26). MRESVIA. U.S. Food And Drug Administration. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/mresvia>
40. Kelleher K, Subramaniam N, Drysdale SB. The recent landscape of RSV vaccine research. *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2025 Jan 10;13:25151355241310601. doi: 10.1177/25151355241310601. PMID: 39802673; PMCID: PMC11724408.
41. Kampmann B, Madhi SA, Munjal I, Simões EA, Pahud BA, Llapur C, et al. (April 2023). "Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV

- Illness in Infants" (PDF). *The New England Journal of Medicine*. 388 (16): 1451–1464. doi:10.1056/NEJMoa2216480
42. Fleming-Dutra KE, Jones JM, Roper LE, Prill MM, Ortega-Sanchez IR, Moulia DL, Wallace M, Godfrey M, Broder KR, Tepper NK, Brooks O, Sánchez PJ, Kotton CN, Mahon BE, Long SS, McMorro ML. Use of the Pfizer Respiratory Syncytial Virus Vaccine During Pregnancy for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus-Associated Lower Respiratory Tract Disease in Infants: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2023 Oct 13;72(41):1115-1122. doi: 10.15585/mmwr.mm7241e1. PMID: 37824423; PMCID: PMC10578951.
43. La Grassa, J. (2023, 4 agosto). Health Canada approves 1st RSV vaccine for people 60 and older. CBC. <https://www.cbc.ca/news/health/rsv-health-canada-vaccine-1.6928175>
44. Dorado (RRID:SCR\_025883), software de basecalling de Oxford Nanopore Technologies. Disponible en: <https://github.com/nanoporetech/dorado>
45. Oxford Nanopore Technologies. Guppy\_barcode (versión 6.5.8), parte del paquete Guppy. Disponible en: <https://nanoporetech.com/> [27 de mayo 2025]
46. Li, H. (2018). *Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences*. *Bioinformatics*, 34(18), 3094-3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
47. Oxford Nanopore Technologies. Medaka (versión 1.8.1) [software]. Disponible en: <https://github.com/nanoporetech/medaka> [Acceso: 27 de mayo 2025].
48. Heng Li. "A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation." *Bioinformatics*. 2011;27(21):2987-2993. doi:10.1093/bioinformatics/btr509.

49. Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E. B., & Neher, R. A. (2021). Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software*, 6(67), 3773. <https://doi.org/10.21105/joss.03773>
50. Shean RC, Makhsous N, Thornlow B, et al. VAPiD: a lightweight cross-platform viral annotation pipeline and identification tool to facilitate virus genome submissions to NCBI GenBank. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):48. doi:10.1186/s12859-019-2597-0.
51. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
52. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
53. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018. doi:10.1093/sysbio/syy032
54. Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. "Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap." *Molecular Biology and Evolution*. 2013 May;30(5):1188-95. doi:10.1093/molbev/mst024
55. Rambaut, A. (2018). FigTree v1.4.4: Graphical viewer of phylogenetic trees. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
56. Rambaut, A., & Suchard, M. A. (2018). TempEst: Exploring the temporal signal in heterochronous sequences. Recuperado de <https://beast.community/tempEst>
57. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 2012;29(8):1969-1973. doi:10.1093/molbev/mss075

58. Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>
59. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018. doi:10.1093/sysbio/syy032
60. Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*. 2019;15(4):e1006650. doi:10.1371/journal.pcbi.1006650
61. Debbag R, Ávila-Agüero ML, Brea J, Brenes-Chacon H, Colomé M, de Antonio R, Díaz-Díaz A, Falleiros-Arlant LH, Fernández G, Gentile A, Gutiérrez IF, Jarovsky D, Del Valle Juárez M, López-Medina E, Mascareñas A, Ospina-Henao S, Safadi MA, Sáez-Llorens X, Soriano-Fallas A, Torres JP, Torres-Martínez CN, Beltrán-Arroyave C. Confronting the challenge: a regional perspective by the Latin American pediatric infectious diseases society (SLIPE) expert group on respiratory syncytial virus-tackling the burden of disease and implementing preventive solutions. *Front Pediatr*. 2024 Jul 31;12:1386082. doi: 10.3389/fped.2024.1386082. PMID: 39144471; PMCID: PMC11322482.
62. Jelley L, Douglas J, O'Neill M, Berquist K, Claasen A, Wang J, Utekar S, Johnston H, Bocacao J, Allais M, de Ligt J, Tan CE, Seeds R, Wood T, Aminisani N, Jennings T, Welch D, Turner N, McIntyre P, Dowell T, Trenholme A, Byrnes C; SHIVERS investigation team; Thomas P, Webby R, French N, Huang QS, Winter D, Geoghegan JL. Spatial and temporal transmission dynamics of respiratory syncytial virus in New Zealand before and after the COVID-19 pandemic. *Nat Commun*. 2024 Nov 11;15(1):9758. doi: 10.1038/s41467-024-53998-5. PMID: 39528493; PMCID: PMC11555088.
63. Bose ME, He J, Shrivastava S, Nelson MI, Bera J, Halpin RA, Town CD, Lorenzi HA, Noyola DE, Falcone V, Gerna G, De Beenhouwer H, Videla C,

- Kok T, Venter M, Williams JV, Henrickson KJ. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory syncytial virus A and B genomes. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3):e0120098. doi: 10.1371/journal.pone.0120098. PMID: 25793751; PMCID: PMC4368745.
64. Deval J, Hong J, Wang G, Taylor J, Smith LK, Fung A, Stevens SK, Liu H, Jin Z, Dyatkina N, Prhavic M, Stoycheva AD, Serebryany V, Liu J, Smith DB, Tam Y, Zhang Q, Moore ML, Fearn R, Chanda SM, Blatt LM, Symons JA, Beigelman L. Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate. *PLoS Pathog*. 2015 Jun 22;11(6):e1004995. doi: 10.1371/journal.ppat.1004995. PMID: 26098424; PMCID: PMC4476725.
65. Deval J, Fung A, Stevens SK, Jordan PC, Gromova T, Taylor JS, Hong J, Meng J, Wang G, Dyatkina N, Prhavic M, Symons JA, Beigelman L. Biochemical Effect of Resistance Mutations against Synergistic Inhibitors of RSV RNA Polymerase. *PLoS One*. 2016 May 10;11(5):e0154097. doi: 10.1371/journal.pone.0154097. PMID: 27163448; PMCID: PMC4862670.
66. 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 Nov 7;24(22):16055. doi: 10.3390/ijms242216055. PMID: 38003246; PMCID: PMC10671726.
67. Patton ME, Moline HL, Whitaker M, Tannis A, Pham H, Toepfer AP, Taylor CA, Goldstein L, Reingold A, Kirley PD, Alden NB, Kawasaki B, Meek J, Kim D, Witt LS, Openo KP, Ryan PA, Mumm E, Lynfield R, Salazar-Sanchez Y, Pacheco F, Keating F, Anderson BJ, Tesini BL, Felsen CB, Sutton M, Thomas A, Schaffner W, Talbot HK, Harbi K, Doran E, Weinberg GA, Staat MA, Payne DC, Halasa NB, Stewart L, Boom JA, Sahni LC, Klein EJ, Englund JA, Williams JV, Michaels MG, Schuster JE, Selvarangan R, Szilagyi PG, Havers FP, Dawood FS. Interim Evaluation of Respiratory Syncytial Virus Hospitalization Rates Among Infants and Young Children

After Introduction of Respiratory Syncytial Virus Prevention Products - United States, October 2024-February 2025. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2025 May 8;74(16):273-281. doi: 10.15585/mmwr.mm7416a1. PMID: 40338822; PMCID: PMC12061057.

68. Hultquist J, Rios-Guzman E, Simons L, Dean T, Agnes F, Pawlowski A, Alisoltanidehkordi A, Nam H, Ison M, Ozer E, Lorenzo-Redondo R. Altered RSV Epidemiology and Genetic Diversity Following the COVID-19 Pandemic. *Res Sq [Preprint]*. 2023 Dec 15:rs.3.rs-3712859. doi: 10.21203/rs.3.rs-3712859/v1. Update in: *Nat Commun.* 2024 Apr 20;15(1):3374. doi: 10.1038/s41467-024-47757-9. PMID: 38168164; PMCID: PMC10760306.
69. Tramuto F, Maida CM, Mazzucco W, Costantino C, Amodio E, Sferlazza G, Previti A, Immordino P, Vitale F. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of Human Respiratory Syncytial Virus in Sicily during Pre- and Post-COVID-19 Surveillance Seasons. *Pathogens.* 2023 Aug 28;12(9):1099. doi: 10.3390/pathogens12091099. PMID: 37764907; PMCID: PMC10534943.
70. Rivera-Toledo, Evelyn & Nepomuceno, Fidencio & Mendoza-Ramirez, Enrique & Vera-Jimenez, America & Becerril, Eduardo & Castillejos, Manuel & Perez-Orozco, Francisco & Benitez, Geovanni & Salazar-Lezama, Miguel & Cadeza-Aguilar, Josue & Garcia-Colin, Emma & Garrido-Galindo, Claudia & Regalado-Pineda, Justino & Wickiser, J. & Vázquez, Joel. (2025). Molecular characterization of human Respiratory Syncytial Virus in Mexico (season 2023-2024) through whole-genome sequencing. 10.21203/rs.3.rs-5975519/v1.
71. Eden JS, Sikazwe C, Xie R, Deng YM, Sullivan SG, Michie A, Levy A, Cutmore E, Blyth CC, Britton PN, Crawford N, Dong X, Dwyer DE, Edwards KM, Horsburgh BA, Foley D, Kennedy K, Minney-Smith C, Speers D, Tulloch RL, Holmes EC, Dhanasekaran V, Smith DW, Kok J, Barr IG; Australian RSV study group. Off-season RSV epidemics in Australia after easing of COVID-19 restrictions. *Nat Commun.* 2022 May 24;13(1):2884.

doi: 10.1038/s41467-022-30485-3. PMID: 35610217; PMCID: PMC9130497.

72. Rios-Guzman E, Simons LM, Dean TJ, Agnes F, Pawlowski A, Alisoltanidehkordi A, Nam HH, Ison MG, Ozer EA, Lorenzo-Redondo R, Hultquist JF. Deviations in RSV epidemiological patterns and population structures in the United States following the COVID-19 pandemic. *Nat Commun.* 2024 Apr 20;15(1):3374. doi: 10.1038/s41467-024-47757-9. PMID: 38643200; PMCID: PMC11032338.
73. Chi H, Hsiao KL, Weng LC, Liu CP, Liu HF. Persistence and continuous evolution of the human respiratory syncytial virus in northern Taiwan for two decades. *Sci Rep.* 2019 Mar 18;9(1):4704. doi: 10.1038/s41598-019-41332-9. PMID: 30886248; PMCID: PMC6423049.
74. Sutto-Ortiz P, Eléouët JF, Ferron F, Decroly E. Biochemistry of the Respiratory Syncytial Virus L Protein Embedding RNA Polymerase and Capping Activities. *Viruses.* 2023 Jan 25;15(2):341. doi: 10.3390/v15020341. PMID: 36851554; PMCID: PMC9960070.
75. Hönemann M, Thiem S, Bergs S, Berthold T, Propach C, Siekmeyer M, Frille A, Wallborn T, Maier M, Pietsch C. In-Depth Analysis of the Re-Emergence of Respiratory Syncytial Virus at a Tertiary Care Hospital in Germany in the Summer of 2021 after the Alleviation of Non-Pharmaceutical Interventions Due to the SARS-CoV-2 Pandemic. *Viruses.* 2023 Mar 29;15(4):877. doi: 10.3390/v15040877. PMID: 37112857; PMCID: PMC10144477.
76. Atchison EB, Croft SN, Mathew C, Brookes DW, Coates M, Ito K, Ghildyal R. Interaction Between the Matrix Protein and the Polymerase Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Viruses.* 2024 Dec 4;16(12):1881. doi: 10.3390/v16121881. PMID: 39772190; PMCID: PMC11680393.
77. Martínez-Marrero N, Muñoz-Escalante JC, Wong-Chew RM, Torres-González P, García-León ML, Bautista-Carbajal P, Martínez-Arce PA, Espinosa-Sotero MDC, Tabla-Orozco V, Rojas-Larios F, Juárez-Tobías S, González-Ortiz AM, Alpuche-Solís ÁG, Noyola DE. Genotypic

Characterization of Human Respiratory Syncytial Viruses Detected in Mexico Between 2021 and 2024. *Viruses*. 2025 Apr 30;17(5):651. doi: 10.3390/v17050651. PMID: 40431663; PMCID: PMC12115737.

78. Rice A, Gonzalez G, Carr M, Dean J, O'Byrne E, Aarts L, Vennema H, Banka W, Bennett C, Cleary S, Domegan L, O'Donnell J, O'Leary M, Goya S, Presser L, Meijer A, Martin G, Sawa H, Waters A, De Gascun C, Hare D. Human respiratory syncytial virus genetic diversity and lineage replacement in Ireland pre- and post-COVID-19 pandemic. *Microb Genom*. 2025 Mar;11(3):001379. doi: 10.1099/mgen.0.001379. PMID: 40096248; PMCID: PMC11914048.
79. Na B, Park YJ, Seo J, Park M, Baek JY, Lee JY, Kim M, Ahn JG, Lee ST, Kang JM. Genotype Analysis of Respiratory Syncytial Virus Before and After the COVID-19 Pandemic Using Whole-Genome Sequencing: A Prospective, Single-Center Study in Korea From 2019 to 2022. *J Korean Med Sci*. 2024 Jul 22;39(28):e206. doi: 10.3346/jkms.2024.39.e206. PMID: 39048301; PMCID: PMC11263766.
80. Alfano F, Bigoni T, Caggiano FP, Papi A. Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults: An Update. *Drugs Aging*. 2024 Jun;41(6):487-505. doi: 10.1007/s40266-024-01118-9. Epub 2024 May 7. PMID: 38713299; PMCID: PMC11193699.
81. Olguin, Tania & Mazagatos, Clara & Galindo-Carretero, Silvia & Vega-Piris, Lorena & Lozano-Álvarez, Marcos & Pérez Gimeno, Gloria & Monge, Susana & Larrauri, Amparo. (2024). Epidemiología y carga de enfermedad por VRS en España. SiVIRA, temporadas 2021-22 y 2022-23. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 32. 21-35. 10.4321/s2173-92772024000100003.

## ANEXOS

### 19.1 Ejecución de alineamiento múltiple de secuencias en entorno Linux

La siguiente línea de comando fue utilizada en el sistema operativo Ubuntu para realizar un alineamiento múltiple de secuencias:

```
mafft alnt_mafft1.fasta > alnt_mafft2.fasta
```

Este comando corresponde a la ejecución del programa MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), una herramienta bioinformática ampliamente utilizada para la alineación múltiple de secuencias de ADN, ARN o proteínas. En este caso, el archivo de entrada `alnt_mafft1.fasta` contiene las secuencias a alinear, y el resultado del alineamiento se redirige al archivo `alnt_mafft2.fasta`.

### 19.2 Selección del modelo evolutivo mediante IQ-TREE 2

La siguiente línea de comando fue utilizada en el sistema operativo Ubuntu como parte del análisis filogenético para determinar el modelo evolutivo más adecuado:

```
iqtree2 -T AUTO -m TESTONLY -s alnt_mafft2.fasta
```

Esta instrucción ejecuta el programa IQ-TREE 2, una herramienta reconocida por su eficiencia y precisión en la inferencia de árboles filogenéticos. El parámetro `-s alnt_mafft2.fasta` especifica el archivo de entrada que contiene el conjunto de secuencias previamente alineadas. La opción `-m TESTONLY` indica que se debe realizar únicamente la selección del modelo evolutivo más adecuado, sin proceder a la construcción del árbol filogenético. Finalmente, la opción `-T AUTO` permite que IQ-TREE detecte automáticamente el número óptimo de núcleos de procesamiento disponibles, optimizando así el rendimiento computacional.

### 19.3 Inferencia filogenética utilizando IQ-TREE 2

Una vez identificado el modelo de sustitución más adecuado, se procedió a inferir el árbol filogenético a partir del alineamiento de secuencias mediante la siguiente línea de comando en el sistema operativo Ubuntu:

```
iqtree2 -s alnt_mafft2.fasta -m TEST --mset beast1 -B 1000 -  
alrt 1000 -T AUTO
```

En este comando, se emplea el programa IQ-TREE 2, el cual toma como entrada el archivo `alnt_mafft2.fasta`, que contiene el conjunto de secuencias previamente alineadas. La opción `-m TEST` permite realizar una reevaluación del modelo de sustitución, mientras que `--mset beast1` restringe la búsqueda a los modelos compatibles con el software BEAST1, lo cual resulta útil en caso de que se planeen análisis filodinámicos posteriores con dicha herramienta.

Los parámetros `-B 1000` y `-alrt 1000` indican que se debe realizar un análisis de soporte estadístico del árbol utilizando 1,000 réplicas de bootstrapping ultrarrápido (UFBoot) y 1,000 réplicas del test de razón de verosimilitud aproximado (aLRT), respectivamente. Por último, `-T AUTO` permite al programa detectar automáticamente el número óptimo de núcleos de procesamiento disponibles, optimizando así el uso de recursos computacionales durante la inferencia del árbol.

### 19.4 Ejecución del análisis bayesiano con BEAST utilizando aceleración por GPU

```
nohup beast -beagle_cuda alnt_mundo_skygrid_300.xml &>  
beast.log &
```

Esta línea de comando permitió ejecutar BEAST aprovechando la aceleración por GPU mediante la biblioteca BEAGLE con soporte CUDA, lo cual incrementó significativamente la velocidad de cómputo. Adicionalmente, el uso de `nohup` aseguró que el proceso continuara ejecutándose incluso si la terminal era cerrada, lo que es especialmente útil en entornos de cómputo remoto o en servidores. El resultado principal del análisis fue almacenado en un archivo de

log (beast.log), además de archivos secundarios que contenían los árboles filogenéticos generados en cada paso del muestreo bayesiano.