

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
MONTEVIDEO-URUGUAY
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
PEDECIBA**

**DINÁMICA EVOLUTIVA DE LOS VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO Y
METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ, Y SUS IMPLICACIONES EN
NUEVAS VACUNAS Y TRATAMIENTOS EN DESARROLLO**

**POR
DANILO E. FRANCO DE L.**

**ORIENTADORA: DRA. ADRIANA DELFRARO
CO-ORIENTADORA: DRA. LEYDA ÁBREGO**

Tesis Sometida a Consideración del Tribunal Examinador del Programa De Desarrollo de
las Ciencias Básicas para Optar al Grado de Doctorado

2026



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas



SECCIÓN
VIROLOGÍA
FCIEN | UDELAR



LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo de tesis doctoral fue ejecutado en su mayor parte dentro del Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), Ciudad de Panamá, Panamá, específicamente en el Laboratorio Especializado Modular de dicho departamento. Los procesos de secuenciación genómica fueron desarrollados en el Departamento de Genómica y Proteómica del ICGES, y los análisis bioinformáticos y filogenéticos se realizaron en el cluster bioinformático institucional del ICGES.

Determinadas actividades experimentales específicas vinculadas a la caracterización y estudio de proteínas virales se desarrollaron durante una estancia de investigación de tres meses en el Laboratorio de Biología Viral del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, España.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedicado a mi familia, en especial a *Lucas* y *Martín*.

Agradezco a Dios por la oportunidad, la fortaleza y la valentía concedidas a lo largo de este camino (Josué 1:9). A mi esposa Zulay y a mis pequeños, por su paciencia, comprensión y por el tiempo que generosamente cedieron para hacer posible este logro. A mis tutoras, Adriana y Leyda, pilares fundamentales en el desarrollo de este trabajo, por su guía, apoyo y confianza en cada etapa del proceso.

Mi gratitud al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, en especial al Laboratorio Modular Especializado, al Departamento de Virología y Biotecnología, al Departamento de Genómica y Proteómica, así como a su Administración y Dirección General; y muy especialmente a mis compañeros de trabajo, por su colaboración y respaldo permanente. De igual manera, al Instituto de Salud Carlos III y al equipo de Biología Viral, por la calidez con la que me recibieron y por brindarme herramientas y recursos que contribuyeron al desarrollo experimental de esta investigación.

Extiendo igualmente mi gratitud a SENACYT, MINSA-Panamá y CSS-Panamá, así como a los colaboradores e investigadores que, de una u otra forma, aportaron tiempo, conocimientos y valiosas contribuciones a lo largo de este proceso. Finalmente, a la Universidad de la República (UDELAR) y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), por ofrecer el marco académico, la formación y el acompañamiento que hicieron posible la culminación de este importante grado académico.

RESUMEN

En esta tesis se presenta la caracterización genómica más extensa realizada en Panamá de dos virus respiratorios de alto impacto, el Virus Sincitial Respiratorio humano (VSRh) y el Metapneumovirus humano (MPVh). El estudio incluyó el análisis de 311 y 187 genomas completos, respectivamente, recolectados a través de la Red Nacional de Vigilancia en Panamá entre 2006 y 2025. Esta cobertura temporal permitió reconstruir con alta resolución la dinámica de circulación, introducción, diversificación y reemplazo de linajes en el país. En VSRh, los datos evidencian una circulación sostenida de ambos subgrupos a lo largo de casi dos décadas, con eventos sucesivos de reemplazo que se intensificaron en los años recientes (2018–2024), periodo en el cual el subgrupo A se diversificó en al menos once linajes (incluyendo A.D, A.D.1.7, A.D.2.2, A.D.2.2.1, A.D.3.2, A.D.3.3, A.D.5 y A.D.5.2), mientras que el subgrupo B estuvo dominado inicialmente por el linaje B.D.4.1.1 y posteriormente por B.D.E.1, que emergió como linaje predominante a partir de 2021. Complementariamente, un panel representativo de aislamientos nacionales fue sometido a ensayos de neutralización con anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína F, demostrando una elevada sensibilidad frente a nirsevimab/MEDI8897*, AM14 y motavizumab, lo que respalda la eficacia potencial de estas inmunoterapias frente a las variantes actualmente circulantes en Panamá. En MPVh, el conjunto de genomas analizados documenta casi veinte años de circulación continua con patrones claros de reemplazo entre los grupos A y B; destaca un marcado predominio de variantes del grupo A que portan duplicaciones en el gen G (A2.2.2-111dup y A2.2.2-180dup), las cuales representan aproximadamente el 77% de las secuencias dentro de este grupo, mientras que el grupo B estuvo conformado por los linajes B1 y B2, mostrando fluctuaciones estacionales y reemplazos periódicos. A pesar de esta dinámica genómica y epidemiológica, la proteína de Fusión se mantuvo notablemente conservada a lo largo de todo el periodo analizado, con divergencias mínimas tanto entre subgrupos como entre linajes, lo que refuerza su estabilidad evolutiva. Estos hallazgos ofrecen el marco genómico más sólido disponible sobre la evolución reciente de VSRh y MPVh en un entorno tropical, fortalecen la comprensión de los patrones de reemplazo viral asociados a cambios epidemiológicos y presiones inmunitarias, y proporcionan evidencia crítica para optimizar la vigilancia genómica, anticipar la aparición de nuevas variantes y orientar la implementación de estrategias de inmunización y terapias basadas en anticuerpos en Panamá.

ABSTRACT

This thesis presents the most extensive genomic characterization conducted in Panama of two high-impact respiratory viruses, Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Human Metapneumovirus (hMPV). The study included the analysis of 311 and 187 complete genomes, respectively, collected through the National Surveillance Network in Panama between 2006 and 2025. This temporal coverage enabled the high-resolution reconstruction of viral circulation, introduction, diversification, and lineage replacement dynamics in the country. For RSV, the data reveal sustained circulation of both subgroups over nearly two decades, with successive replacement events that intensified in recent years (2018–2024). During this period, subgroup A diversified into at least eleven lineages (including A.D, A.D.1.7, A.D.2.2, A.D.2.2.1, A.D.3.2, A.D.3.3, A.D.5, and A.D.5.2), while subgroup B was initially dominated by lineage B.D.4.1.1 and later by B.D.E.1, which emerged as the predominant lineage from 2021 onward. In parallel, a representative panel of national isolates was evaluated in neutralization assays using monoclonal antibodies targeting the F protein, demonstrating high sensitivity to nirsevimab/MEDI8897*, AM14, and motavizumab. These results support the potential effectiveness of these immunotherapies against the RSV variants currently circulating in Panama. In hMPV, the set of analyzed genomes documents nearly two decades of continuous circulation with clear patterns of replacement between groups A and B. A striking predominance of group A variants carrying duplications in the G gene (A2.2.2-111dup and A2.2.2-180dup) was observed, representing approximately 77% of sequences within this group, whereas group B consisted of lineages B1 and B2, showing seasonal fluctuations and periodic replacements. Despite this genomic and epidemiological dynamism, the Fusion protein remained remarkably conserved over the entire study period, with minimal divergence across subgroups and lineages, reinforcing its evolutionary stability. Together, these findings provide the most robust genomic framework available for understanding the recent evolution of RSV and hMPV in a tropical setting. They enhance our comprehension of viral replacement patterns driven by epidemiological shifts and immune pressures, and they offer critical evidence to strengthen genomic surveillance, anticipate the emergence of new variants, and guide the deployment of immunization strategies and antibody-based therapies in Panama.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO	ii
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS Y DEFINICIONES	9
INTRODUCCIÓN: <i>ESTADO DEL ARTE DEL RSVh Y MPVh</i>	12
1. Historia: Desde el descubrimiento a la actualidad	
1.1. Virus Sincitial Respiratorio	13
1.2. Metapneumovirus humano	14
2. Estructura viral: morfología y organización genómica	15
3. Proteínas virales: estructura y funciones en la infección y evasión inmune	
3.1. Proteínas no estructurales: NS1 y NS2	17
3.2. Proteínas de superficie: G, F y SH	18
3.3. Complejo de replicación y transcripción: N, P, L y M2-1	28
3.4. Proteína de ensamblaje: M (matriz)	34
3.5. Proteína reguladora: M2-2	36
4. Clasificación	
4.1. Virus Sincitial Respiratorio	37
4.2. Metapneumovirus humano	38
5. Epidemiología	
5.1. Prevalencia global y regional	39
5.2. Variaciones estacionales	40
5.3. Transmisión	41
5.4. Patrón de circulación y linajes detectados	
5.4.1. Virus Sincitial Respiratorio	42
5.4.2. Metapneumovirus humano	43

6.	Manifestaciones clínicas	44
7.	Factores de riesgo para infección grave	46
8.	Diagnóstico por laboratorio	47
9.	Estrategias preventivas y terapéuticas: avances y perspectivas	
9.1.	Virus Sincitial Respiratorio	48
9.2.	Metapneumovirus humano	57
9.3.	Sustituciones aminoacídicas de relevancia terapéutica	64
10.	Situación Actual en Panamá y Brecha de Conocimiento	66
HIPÓTESIS		68
OBJETIVOS		68
CAPÍTULO I:	<i>DINÁMICA EVOLUTIVA Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VSRh EN PANAMÁ (2006–2024): CLASIFICACIÓN FILOGENÓMICA Y EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN ANTIGÉNICA FRENTE A ANTICUERPOS ANTI-F</i>	69
1.	Materiales y Métodos	71
2.	Resultados y Discusión	78
2.1	Periodo 2006-2017	79
2.2	Periodo 2018-2024	99
2.3	Panorama integrador de la dinámica evolutiva del VSRh en Panamá (2006–2024)	114
4.	Conclusiones	120
CAPÍTULO II:	<i>PANORAMA GENÓMICO, DIVERSIDAD, PATRONES DE REEMPLAZO Y VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ A LO LARGO DE 20 AÑOS</i>	122
1.	Materiales y Métodos	124

2.	Resultados	129
2.1	Patrón epidemiológico del MPVh en Panamá (2006–2025)	129
2.2	Dinámica de Subgrupos y Linajes	133
2.3	Análisis de la Proteína de Fusión	140
3.	Discusión	147
4.	Conclusiones	156

CONCLUSIONES GENERALES	157
LIMITACIONES	160
PERSPECTIVAS Y LÍNEAS FUTURAS	161
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
ANEXOS	188
ÍNDICE DE FIGURAS	189
ÍNDICE DE TABLAS	191
CERTIFICADOS	193
MATERIAL SUPLEMENTARIO DE ARTÍCULO CIENTÍFICO	199

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

- **4PL:** Four-parameter logistic model; modelo sigmoideal usado para ajustar curvas de neutralización.
- **A.D:** Clado del subgrupo A del VSRh correspondiente al genotipo ON1.
- **AEC:** 3-amino-9-etilcarbazol; sustrato cromogénico para inmunohistoquímica.
- **AM&P:** Área Metropolitana y Periferia.
- **AM14:** Anticuerpo monoclonal dirigido principalmente al sitio antigénico IV de la proteína F del VSRh.
- **AM22:** Anticuerpo monoclonal dirigido al sitio antigénico Ø de la proteína F del VSRh.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ARNm:** ARN mensajero.
- **B.D:** Clado del subgrupo B del VSRh según clasificación genómica.
- **BSA:** Bovine Serum Albumin; albúmina sérica bovina.
- **CDC:** Centers for Disease Control and Prevention; agencia de salud pública de Estados Unidos.
- **cDNA:** ADN complementario generado a partir de ARN por transcriptasa inversa.
- **CHAPS:** 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato; detergente zwitteriónico para solubilizar membranas.
- **COVID-19:** Coronavirus Disease 2019; enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2.
- **Ct:** Cycle threshold; número de ciclo en la RT-qPCR en el que la señal cruza el umbral de detección.
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium; medio de cultivo celular.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido; disolvente utilizado en biología molecular.
- **DS7:** Anticuerpo monoclonal dirigido al sitio antigénico I de la proteína F del MPVh.
- **EpiRSV:** Módulo RSV de la plataforma GISAID para datos de VSRh.
- **ER:** Retículo endoplásmico.
- **ETI:** Enfermedad Tipo Influenza.

- **F:** Glicoproteína de Fusión en VSRh y MPVh.
- **Fastp:** Programa de filtrado y recorte de lecturas de secuenciación de nueva generación.
- **FASTQ:** Formato estándar de archivos de lecturas de secuenciación NGS.
- **FFU:** Focus-Forming Units; unidades formadoras de focos infecciosos.
- **G:** Glicoproteína G en VSRh y MPVh.
- **GenBank:** Base de datos de secuencias genéticas del NCBI.
- **GISAID:** Global Initiative on Sharing All Influenza Data; plataforma para intercambio de secuencias virales.
- **HEp-2:** Línea celular epitelial humana usada para aislamiento de VSRh.
- **HNF:** Hisopado nasofaríngeo.
- **HRP:** Horseradish peroxidase; peroxidasa de rábano picante.
- **IC₅₀:** Concentración inhibitoria media.
- **ICGES:** Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.
- **INFLUMIKA:** Estudio clínico-epidemiológico de infecciones respiratorias virales en Panamá.
- **IRA:** Infección Respiratoria Aguda.
- **IRAG:** Infecciones Respiratorias Agudas Graves.
- **iTOL:** Interactive Tree of Life; herramienta web para visualizar y anotar árboles filogenéticos.
- **LRTI:** Lower Respiratory Tract Infection; infecciones respiratorias bajas.
- **mAbs:** Monoclonal antibodies; anticuerpos monoclonales.
- **MAFFT:** Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; programa para alineamiento múltiple de secuencias.
- **MEDI8897*:** Versión de laboratorio precursora del anticuerpo monoclonal nirsevimab.
- **MF14:** Anticuerpo monoclonal anti-F de metapneumovirus humano.
- **MINSA:** Ministerio de Salud de Panamá.
- **MPE8:** Anticuerpo monoclonal de amplio espectro dirigido al sitio antigénico III de la proteína F.

- **MPVh:** Metapneumovirus humano.
- **NCBI:** National Center for Biotechnology Information; centro nacional de información biotecnológica de EE. UU.
- **NGS:** Next-Generation Sequencing; secuenciación de nueva generación.
- **NIC:** National Influenza Center; Centro Nacional de Influenza.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **OpenEpi:** Plataforma en línea de código abierto para análisis epidemiológicos y cálculos estadísticos.
- **PATH:** Program for Appropriate Technology in Health; organización dedicada a tecnologías apropiadas en salud.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **FRNT:** Focus Reduction Neutralization Test; ensayo de neutralización por reducción de focos.
- **PS:** Polisacárido; componente de algunas vacunas conjugadas.
- **RBD:** Receptor Binding Domain; dominio de unión al receptor.
- **RNA:** Ribonucleic acid; ácido ribonucleico.
- **RT-PCR:** Reverse Transcription PCR; reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- **SSIV:** SuperScript IV First-Strand Synthesis System; sistema de síntesis de primera cadena de cDNA.
- **VLP:** Virus-Like Particle; partícula tipo virus utilizada en vacunas y estudios inmunológicos.
- **VSRh:** Virus Sincitial Respiratorio humano.
- **WB:** Western blot; técnica de inmunoblot para detección de proteínas.
- **WGS:** Whole Genome Sequencing; secuenciación de genoma completo.

INTRODUCCIÓN

La presente introducción ofrece una revisión sintética y actualizada del *estado de arte* sobre el VSRh y el MPVh. Su objetivo es proporcionar un marco claro y actualizado que permita comprender la dinámica, la biología y el impacto sanitario de estos virus. A continuación, se presentan los principales hitos desde su descubrimiento, junto con los aspectos fundamentales de su morfología, organización genómica y funciones proteicas, elementos clave para entender los mecanismos de infección, replicación y evasión inmune que caracterizan a ambos patógenos.

Asimismo, se describen los sistemas de clasificación vigentes, destacando la transición desde enfoques centrados en la proteína G hacia esquemas filogenómicos más robustos y armonizados. Se resumen también los patrones epidemiológicos, incluyendo prevalencia, estacionalidad y linajes circulantes, así como los factores que modulan su transmisión en distintos contextos geográficos y poblacionales. Posteriormente, se detallan las manifestaciones clínicas en los grupos de riesgo más afectados y los principales métodos diagnósticos utilizados para su detección, señalando sus aplicaciones y limitaciones.

Finalmente, se ofrece una visión general de las estrategias preventivas y terapéuticas disponibles o en desarrollo, abarcando anticuerpos monoclonales (mAbs), vacunas de diversas plataformas y antivirales emergentes, así como la situación actual del VSRh y del MPVh en Panamá en un escenario de reciente implementación de nuevas intervenciones y necesidad de actualización genómica. Esta introducción proporciona la base conceptual necesaria para contextualizar los análisis desarrollados en los capítulos siguientes.

1. HISTORIA: DESDE EL DESCUBRIMIENTO A LA ACTUALIDAD

1.1 VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

El VSR fue descubierto en 1956 por Morris, Blount y Savage durante la investigación de un brote respiratorio en chimpancés de laboratorio, aislándose inicialmente el denominado Chimpanzee Coryza Agent (CCA) (Morris et al., 1956). Poco después, Chanock y colaboradores demostraron su capacidad patógena en niños hospitalizados con bronquiolitis y neumonía, rebautizándolo como Virus Sincital Respiratorio humano (VSRh), en alusión a la formación de sincitios inducida por la fusión celular (Chanock & Finberg, 1957).

Durante la década de 1960, el VSRh se consolidó como el principal agente etiológico de infección respiratoria aguda infantil y una de las mayores causas de hospitalización en lactantes (Jha et al., 2016). El intento temprano de desarrollar una vacuna inactivada con formalina culminó en 1966 con resultados adversos graves, incluyendo hiperreactividad pulmonar y muertes tras la infección natural (Kim et al., 1969). Este evento histórico marcó el inicio de un largo periodo de prudencia en el desarrollo vacunal contra el VSRh y estableció el concepto de “*vaccine-associated immune enhancement*”, fenómeno que décadas después se comprendió como resultado de una respuesta inmunitaria desbalanceada. (Castilow et al., 2007; Kim et al., 1969)

Posteriormente, la vigilancia epidemiológica evidenció que el VSRh también afecta a adultos mayores e inmunocomprometidos, con una carga de enfermedad comparable a la influenza estacional (Shi et al., 2017). Desde los años 2000, la incorporación de PCR en tiempo real y secuenciación genómica ha permitido caracterizar con mayor precisión su transmisión, variabilidad genética y patrones estacionales (Jha et al., 2016).

En el siglo XXI, el VSRh se reconoce como un patógeno respiratorio de alta carga hospitalaria global (Hanage & Schaffner, 2025). El desarrollo de plataformas de

secuenciación y herramientas bioinformáticas ha impulsado una nueva etapa en su estudio, integrando epidemiología molecular, caracterización filogenética y vigilancia de mutaciones relevantes para vacunas y anticuerpos monoclonales (Asseri, 2025; Wang et al., 2022). Tras siete décadas de investigación, el VSRh se sitúa hoy en una nueva era de prevención e inmunoprofilaxis.

1.2 METAPNEUMOVIRUS HUMANO (MPVh)

El MPVh fue descubierto en 2001 en los Países Bajos al analizar muestras respiratorias pediátricas con clínica compatible con VSRh, pero sin agente etiológico identificado, permitiendo reconocer un “nuevo virus” (van den Hoogen et al., 2001). Estudios serológicos retrospectivos demostraron que ya circulaba desde la década de 1950, evidenciado por anticuerpos detectados en sueros recolectados en 1958, lo que indica que había permanecido inadvertido durante varias décadas (van den Hoogen et al., 2001). Análisis filogenéticos posteriores sugieren que el MPVh evolucionó a partir del metapneumovirus aviar hace al menos 200 años, tras un evento zoonótico de adaptación al ser humano que dio origen a los genotipos y sublinajes actualmente reconocidos (de Graaf et al., 2008; Jesse et al., 2022).

Durante las últimas dos décadas, la investigación sobre el MPVh ha avanzado notablemente, desde su caracterización molecular inicial hasta la comprensión de su impacto epidemiológico global y las estrategias de prevención y control. Para la década del 2000, se consolidó el aislamiento viral, la descripción genómica y su asociación con cuadros de bronquiolitis y neumonía infantil, demostrando su papel como un importante patógeno respiratorio pediátrico (Panda et al., 2014). Para el periodo 2010-2020, se produjeron avances sustanciales en el conocimiento molecular y epidemiológico del virus, impulsados por nuevas herramientas de biología molecular y genómica que permitieron ampliar la comprensión de su diversidad y mecanismos de infección (Heim et al., 2025). En el último lustro, el MPVh

ha adquirido mayor relevancia sanitaria, con brotes reportados por la OMS, incluido el de 2024 en China, cuyo impacto fue comparable al del VSRh y la influenza, subrayando la necesidad de fortalecer la vigilancia genómica global (Goya et al., 2025; Mohammadi et al., 2025).

2. ESTRUCTURA VIRAL: MORFOLOGÍA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Las partículas del VSRh y del MPVh son pleomórficas, adoptando tanto formas esféricas como filamentosas de longitudes variables (Figura 1) (Bächi & Howe, 1973; van den Hoogen et al., 2001). Ambos son virus envueltos pertenecientes a la familia *Pneumoviridae*, aunque se clasifican en géneros distintos: *Orthopneumovirus* para el VSRh y *Metapneumovirus* para el MPVh (Rima et al., 2017).

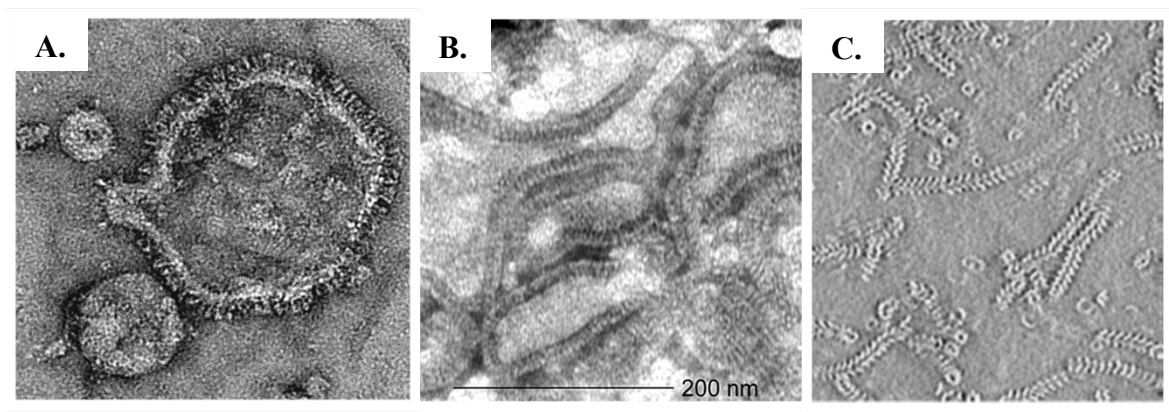


Figura 1. Morfología de la familia *Pneumoviridae* (Rima et al., 2017; van den Hoogen et al., 2001). (A) Virión íntegro de VSRh obtenido por microscopía electrónica de contraste negativo, mostrando partículas esféricas y filamentosas con proyecciones glicoproteicas. (B) Partículas de MPVh visualizadas por microscopía electrónica, exhibiendo morfología filamentosa característica. (C) Nucleocápsides helicoidales de VSRh observadas mediante crio-tomografía, con un diámetro aproximado de ~15 nm y un paso helicoidal de ~6.8 nm.

El genoma del VSRh está constituido por una molécula de ARN monocatenario de sentido negativo, no segmentada, de aproximadamente 15.2 kb, que codifica 11 proteínas tanto estructurales como no estructurales, dispuestas en el orden 3'–NS1–NS2–N–P–M–SH–G–F–M2–L–5' (Figura 2), flanqueadas por regiones líder (3') y tráiler (5') que regulan la

transcripción y replicación mediadas por la ARN polimerasa viral (Bergeron & Tripp, 2021; Collins et al., 2013). En contraste, el MPVh presenta un genoma más corto, de alrededor de 13.3 kb, que carece de los genes no estructurales NS1 y NS2, pero mantiene una organización similar: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' (Figura 2). Este genoma codifica ocho genes que expresan nueve proteínas (Biacchesi et al., 2007; van den Hoogen et al., 2002). Las regiones terminales líder y tráiler cumplen funciones regulatorias equivalentes a las del VSRh, coordinando la transcripción y replicación del genoma por la ARN polimerasa dependiente de ARN.

La ausencia de NS1 y NS2 en MPVh influye en su interacción con el hospedero, ya que estas proteínas del VSRh actúan como antagonistas potentes de la respuesta interferón, modulando la evasión inmune (Ditt et al., 2011; Van Royen et al., 2022). A pesar de estas diferencias, ambos virus comparten la morfología pleomórfica, la estructura genómica lineal no segmentada y la dependencia de la misma maquinaria replicativa, lo que los consolida como pneumovirus estrechamente relacionados dentro de la familia *Pneumoviridae*.

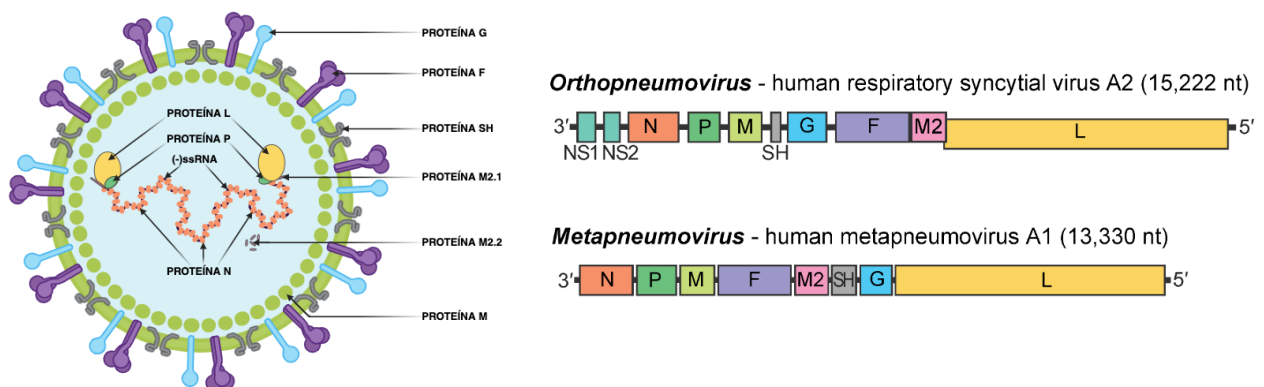


Figura 2. Organización genómica comparada y representación estructural del VSRh y del MPVh. A la izquierda, esquema de la partícula viral envuelta que ilustra las principales proteínas estructurales y el genoma de ARN monocatenario de sentido negativo, creado con BioRender.com. A la derecha, representación del orden génico de los dos principales miembros humanos de la familia *Pneumoviridae*. El VSRh presenta los genes no estructurales NS1 y NS2, ausentes en MPVh, y ubica SH entre los genes M y G. En MPVh, en cambio, SH se localiza entre M2 y G. A pesar de estas diferencias puntuales, ambos virus conservan la organización central N-P-M-F-M2-L característica de los neumovirus (Rima et al., 2017).

3. PROTEÍNAS VIRALES: ESTRUCTURA Y FUNCIONES EN LA INFECCIÓN Y EVASIÓN INMUNE

Las proteínas virales cumplen funciones específicas en la infección, replicación y evasión del sistema inmunitario. Estas proteínas desempeñan papeles esenciales en la unión viral, la fusión de membranas, la replicación del ARN, el ensamblaje del virión y la modulación de la respuesta inmune del hospedero.

3.1 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES: NS1 Y NS2

Las proteínas NS1 y NS2 son exclusivas del VSRh y se denominan no estructurales porque no se incorporan al virión maduro (Van Royen et al., 2022). A diferencia de otros virus del orden *Mononegavirales*, el VSRh sí codifica estas proteínas, las cuales representan una diferencia estructural y funcional clave dentro de la familia *Pneumoviridae* (Battles & McLellan, 2019; Van Royen et al., 2022). Estas proteínas han evolucionado para adquirir mecanismos sofisticados que suprimen la producción y señalización del interferón tipo I (IFN), constituyéndose en factores determinantes de evasión inmunitaria (Van Royen et al., 2022).

Ambas proteínas bloquean la maduración de las células dendríticas, interfiriendo con su capacidad de presentar antígenos y activar linfocitos T (Bohmwald et al., 2016; Liljeroos et al., 2013). En células epiteliales bronquiales humanas, la expresión de NS1 y NS2 reduce la polarización de linfocitos hacia los fenotipos Th1, Th2 y Th17, mediante una modulación indirecta del microambiente de citocinas (Bohmwald et al., 2016; Liljeroos et al., 2013). Además, la presencia de NS1 y NS2 se ha asociado a una menor producción de IFN y mayor susceptibilidad celular al daño por infección respiratoria, evidenciando su papel como

potentes factores de virulencia que desarticulan las defensas antivirales innatas y facilitan la replicación viral (Van Royen et al., 2022).

Se ha propuesto que NS1 y NS2 actúan en conjunto para antagonizar la maduración de las células dendríticas, alterar la señalización del interferón tipo I y evitar la activación de linfocitos T, contribuyendo así a la persistencia del virus y a la diseminación en el epitelio respiratorio (Thornhill & Verhoeven, 2020; Van Royen et al., 2022).

En contraste, el MPVh carece de NS1 y NS2, y su mecanismo de evasión del interferón depende principalmente de las funciones moduladoras de las proteínas G y M2-2, que suprimen parcialmente la señalización de IFN y regulan la replicación viral (Bao, Liu, et al., 2008; Ribó-Molina et al., 2025).

3.2 PROTEINAS DE SUPERFICIE: G, F Y SH

3.2.1 GLICOPROTEÍNA G (ADHESIÓN)

La glicoproteína G del VSRh, con una longitud variable de aproximadamente 289 a 322 aminoácidos, constituye la principal proteína de adhesión del virión y media la unión del virus a las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, iniciando el proceso infeccioso (Bohmwald et al., 2016; Collins et al., 2013). Fue descrita inicialmente por Seymour Levine como una proteína fuertemente glicosilada de 80 kDa presente en viriones purificados producidos en células HeLa (Levine, 1977), demostrando que los anticuerpos dirigidos contra G impedían la unión del virus a las células huésped (Levine, 1977).

El esqueleto proteico de G está extensamente modificado con 30-40 glicanos O-ligados y 4-5 N-ligados, representando alrededor del 60 % de su masa molecular (Figura 3) (Satake et al., 1985; Wertz et al., 1985). Estos glicanos, ricos en serina y treonina, confieren a la proteína una naturaleza similar a las mucinas respiratorias, aunque de menor tamaño (Collins &

Mottet, 1992). La glicosilación y palmitoilación de G son esenciales para su función de anclaje a la membrana y su correcta conformación (Collins & Mottet, 1992).

Estructuralmente, G puede presentarse como monómero o dímero con tres regiones funcionales: dos regiones O-glicosiladas con características tipo mucina (mucin-like), altamente variables y localizadas en los extremos N- y C-terminal, y una región central conservada que incluye cuatro cisteínas (Cys173, Cys176, Cys182 y Cys186) conectadas por puentes disulfuro (Figura 3) (Gorman et al., 1997). Esta región contiene un dominio de unión a heparán sulfato (HBD) que facilita la interacción con glucosaminoglicanos de la superficie celular y la entrada en las células (Feldman et al., 1999). Flanqueando esta zona, los dominios mucinosos contribuyen a la alta variabilidad de G, siendo esta la proteína más variable del VSRh, un rasgo ampliamente aprovechado en estudios evolutivos (Collins et al., 2013; Garcia et al., 1994; Goya et al., 2020; Martínez et al., 1999; Trento et al., 2003, 2015).

La G se expresa en dos formas: una forma unida a membrana (mG) y una forma soluble (sG) (Bukreyev et al., 2008; Van Royen et al., 2022). Aproximadamente el 80 % de la G sintetizada se libera como sG al medio extracelular, mientras que el 20% restante se incorpora a la envoltura viral (Bukreyev et al., 2008). La forma sG, generada por el inicio de traducción alternativo en el segundo codón AUG (Roberts et al., 1994), carece del dominio transmembrana y actúa como señuelo antigénico, uniéndose a anticuerpos neutralizantes y reduciendo la eficacia de la respuesta inmune (Bukreyev et al., 2008, 2012).

Además, la G contiene un motivo CX₃C que imita la quimiocina fractalcina (CX₃CL1) y compite por el receptor CX₃CR1 en monocitos y linfocitos, interfiriendo con la migración y el reclutamiento celular (Figura 3) (Bohmwald et al., 2016; Tripp et al., 2001).

Estudios moleculares demostraron que, a pesar de la alta tasa de mutación del gen G, la región central que contiene las cisteínas permanece altamente conservada y mantiene su

antigenicidad (Trento et al., 2015). No obstante, se han identificado duplicaciones en la región distal del ectodominio que generan repeticiones parciales de aminoácidos y aumentan la longitud y glicosilación de la proteína (Eshaghi et al., 2012; Trento et al., 2003). Estas duplicaciones otorgan ventajas adaptativas al facilitar el enmascaramiento antigénico y modificar la exposición de epítopos neutralizantes, sin alterar la función conservada de adhesión e inmunomodulación (Trento et al., 2003, 2015).

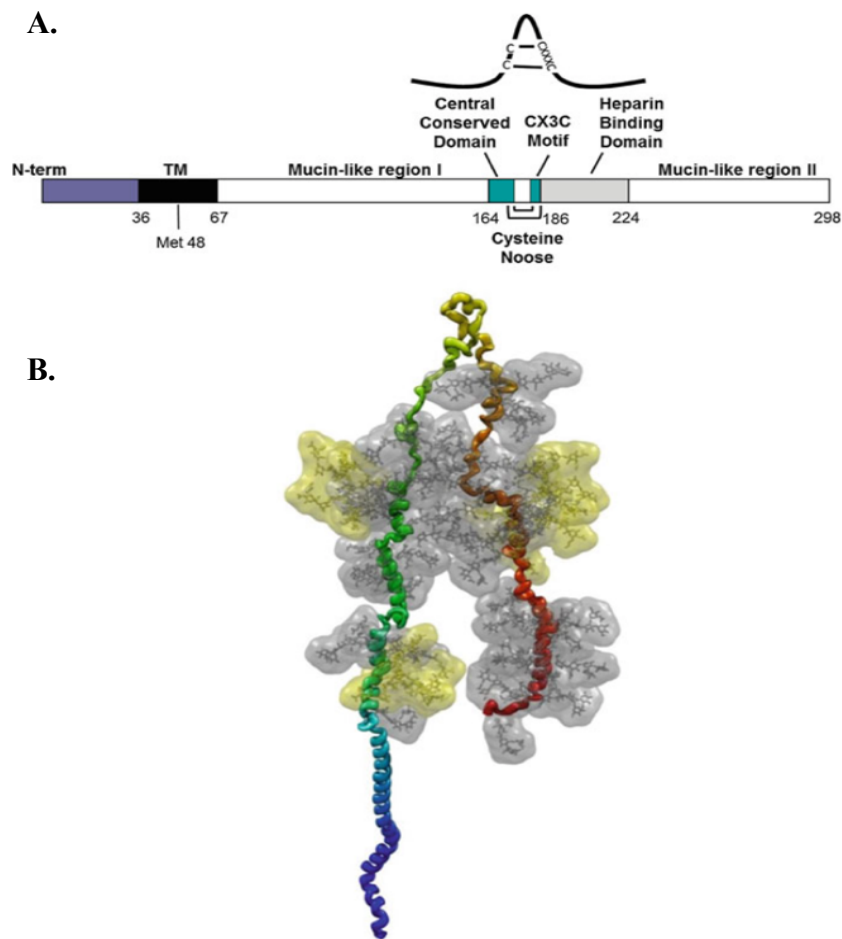


Figura 3. Organización estructural y representación tridimensional de la glicoproteína G del VSRh (McLellan, Ray, et al., 2013). (A) Esquema lineal de la proteína G del VSRh que ilustra la disposición de sus dos regiones tipo mucina altamente glicosiladas, el dominio central conservado que contiene el motivo CX₃C y el lazo de cisteínas estabilizado por puentes disulfuro. Se indican también el dominio transmembrana y las regiones N- y C-terminal. (B) Modelo tridimensional obtenido mediante dinámica molecular, que muestra la conformación general de G y la distribución espacial aproximada de los glicanos N- y O-ligados, reflejando la alta densidad de glicosilación que caracteriza a esta proteína.

Por otra parte la glicoproteína G del MPVh también tiene una longitud variable, entre aproximadamente 219 y 279 aminoácidos, según el linaje, que cumple un papel multifuncional en la interacción virus-hospedero, combinando funciones de adhesión con una marcada capacidad inmunomoduladora (Chakraborty, 2025; van den Hoogen et al., 2002; Velayutham et al., 2022). Similar a su homóloga del VSRh, su ectodominio es rico en residuos de serina y treonina, se encuentra extensamente O-glicosilado, lo que le confiere una naturaleza similar a las mucinas respiratorias y contribuye al enmascaramiento antigénico y a la evasión de la respuesta humoral (van den Hoogen et al., 2001; Velayutham et al., 2022). En este dominio se localizan regiones hipervariables en el extremo C-terminal, donde se concentran las duplicaciones y deleciones que modifican la longitud y glicosilación de la proteína, un fenómeno comparable al descrito para la glicoproteína G del VSRh siendo también clave para estudios evolutivos (Goya et al., 2020; Groen et al., 2023; van den Hoogen et al., 2002).

Diversos estudios han identificado a la G de MPVh como un importante factor de virulencia, capaz de suprimir las vías antivirales del hospedero. Esta glicoproteína puede modular el microambiente inflamatorio pulmonar al favorecer el reclutamiento de neutrófilos mediante la inducción de quimiocinas como CXCL2, CCL3 y CCL4, así como la producción de IL-17 y TNF, contribuyendo a la inmunopatología característica de la infección por MPVh (Garg et al., 2025). En modelos murinos, la delección del gen G genera un fenotipo atenuado, con replicación restringida, menor inflamación pulmonar, escasa expresión de citocinas proinflamatorias y ausencia de enfermedad clínica, aunque conserva la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes protectores (Velayutham et al., 2022).

La glicoproteína G del MPVh constituye un componente esencial para la virulencia y persistencia del virus, al combinar un papel estructural de anclaje con sofisticados mecanismos de supresión de la respuesta inmune innata y adaptativa.

3.2.2 GLICOPROTEÍNA F (FUSIÓN)

La glicoproteína F de VSRh es de 574 aminoácidos, además de ser la principal proteína de fusión del VSRh, es el antígeno neutralizante más importante del virión (Bohmwald et al., 2016). Es una proteína de clase I, altamente conservada con menos del 10 % de divergencia en su secuencia, y su estructura trimérica es esencial para la infectividad (Bohmwald et al., 2016).

Esta proteína se sintetiza inicialmente como un precursor inactivo F_0 , el cual se ensambla en trímeros en etapas tempranas de maduración. Durante su tránsito por el aparato de Golgi, una proteasa tipo furina escinde cada monómero en dos subunidades, F_1 y F_2 , unidas por dos puentes disulfuro, liberando además un péptido intermedio de 27 aa (pep27) (Figura 4) (Collins et al., 1984; González-Reyes et al., 2001). Este procesamiento genera el trímero maduro de tipo I de membrana integral. El extremo N-terminal de F_1 contiene el péptido de fusión (FP), un dominio hidrofóbico que se inserta en la membrana celular durante la fusión (Figura 4).

Cada monómero F_1/F_2 está glicosilado con 5-6 N-ligandos, esenciales para su estabilidad conformacional y antigenicidad (P. Li et al., 2007; Zimmer et al., 2001). El trímero funcional puede adoptar dos conformaciones estructurales: prefusión (pre-F) y posfusión (post-F). La pre-F es un estado metastable y altamente inmunogénico, donde se exponen epítomos conformacionales críticos para la neutralización, incluyendo los sitios antigénicos Ø, I, II, III, IV y V, (Figura 4) y al menos un sitio cuaternario dependiente de la escisión y del

ensamblaje trimérico (Gilman et al., 2015, 2016; McLellan, Chen, Leung, et al., 2013). El sitio Ø, localizado en el ápice del trímero, es exclusivo de la conformación pre-F y desaparece tras la reorganización al estado post-F. Los sitios II y IV, en cambio, son regiones más conservadas que pueden reconocerse tanto en pre-F como en post-F. En los últimos años, se identificaron los sitios III y V en la región media del dominio F₁, cuya exposición depende de la orientación de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 5$ y de las asas $\beta 3$ - $\beta 4$, estructuras que sufren desplazamientos significativos durante el reordenamiento conformacional (Figura 4) (Gilman et al., 2016).

Además de estos epítomos monoméricos, el análisis estructural de la proteína F trimérica reveló la existencia de un epítomo cuaternario, formado por la interacción entre protómeros adyacentes del trímero y ausente en la forma monomérica o no escindida (Gilman et al., 2015). Este sitio involucra regiones del dominio F₁ situadas entre la zona media y proximal de la molécula, cuya formación depende estrictamente de la trimerización y escisión por furina, procesos que facilitan el reacomodo estructural necesario para su exposición (Gilman et al., 2015).

Durante la entrada viral, la activación de F por interacción con receptores desencadena un cambio irreversible de pre-F a post-F, en el cual las hélices HRA y HRB, dos regiones con repeticiones heptádicas características de las proteínas de fusión de clase I, se reconfiguran para formar un haz de seis hélices (6HB) que aproxima las membranas viral y celular. Este reordenamiento elimina los epítomos Ø, V y el cuaternario, consolidando la transición estructural propia de las proteínas de fusión de clase I (McLellan et al., 2011; Zhao et al., 2000).

La glicoproteína F representa un complejo estructural altamente conservado, dinámico y esencial para la infectividad del VSRh. Su conformación trimérica y los epítomos

conformacionales que emergen durante su maduración proteolítica definen los principales determinantes de neutralización y la base molecular de las estrategias actuales de inmunización y desarrollo de antivirales.

Por otra parte, y muy parecido a VSRh, la glicoproteína F del MPVh también es una proteína de fusión de clase I, trimérica y altamente conservada, ligeramente más pequeña, con una longitud de 539 aminoácidos, que comparte la capacidad de inducir la fusión de membranas y la formación de sincitios, características distintivas de este tipo de proteínas (Heim et al., 2025; Schowalter et al., 2006; van den Hoogen et al., 2002).

La proteína F se sintetiza como un trímero inactivo que requiere escisión proteolítica para adquirir su forma funcional (Heim et al., 2025). Similar a VSRh y a otros Pneumovirus, la proteína F de MPVh inicia en un estado pre-F metastable y, tras estímulos del hospedero, pasa a la conformación post-F mediante cambios que incluyen la exposición del péptido de fusión, su inserción en la membrana opuesta y un replegamiento que aproxima ambas membranas; la energía liberada conduce a la mezcla lipídica y a la formación de un poro que permite el paso del nucleocápside al citoplasma (Heim et al., 2025).

A nivel estructural, la F del MPVh mantiene una arquitectura trimérica homóloga a la del VSRh, pero con una identidad de secuencia cercana al 33%, aunque las diferencias se distribuyen a lo largo de la molécula (Mas et al., 2018). En comparación con los sitios antigénicos del VSRh, la F del MPVh conserva regiones específicas dentro de los sitios III y IV, mientras que los sitios Ø y II muestran una mayor variabilidad. Además, el sitio Ø podría estar parcialmente cubierto por un escudo de glicanos en el ápice de la molécula, lo que limitaría la exposición de epítomos superficiales y explicaría la baja reactividad cruzada observada entre ambos virus (Mas et al., 2018).

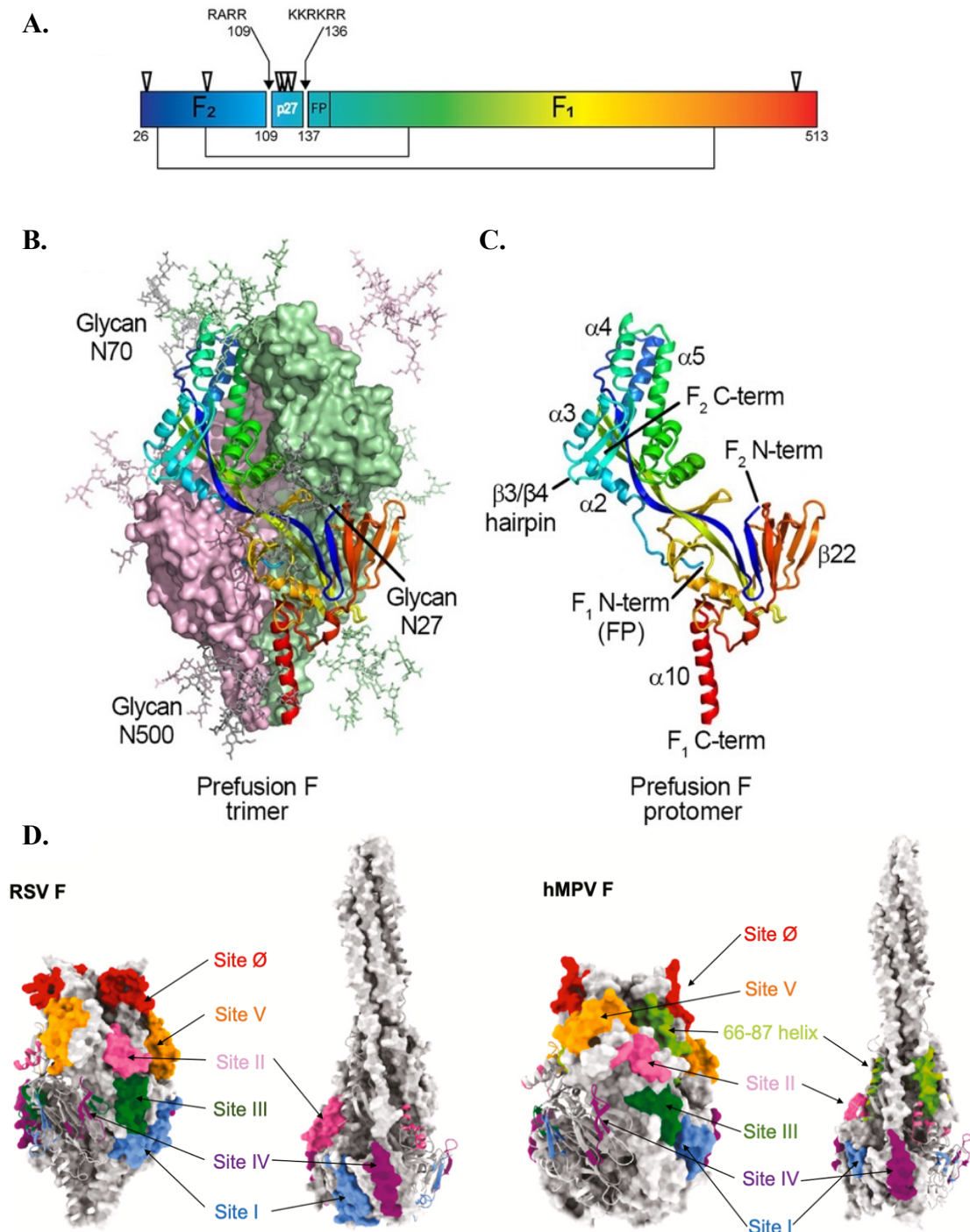


Figura 4. Organización estructural y sitios antigénicos de la glicoproteína F de los pneumovirus (Miller & Mousa, 2023; Rezende et al., 2023). (A) Esquema lineal de la glicoproteína F indicando los dominios principales y la región de escisión proteolítica F₁/F₂. (B) Estructura tridimensional del trímero de F en conformación pre-F con la localización de glicanos N-ligados. (C) Protómero individual de F en pre-F mostrando elementos estructurales clave (hélices α , asas β y péptido de fusión). (D) Comparación de los sitios antigénicos de F en conformación pre-F y pos-F en RSV y MPVh.

3.2.3 PROTEÍNA SH (SMALL HYDROPHOBIC)

La proteína SH de VSRh es una pequeña proteína hidrofóbica transmembrana integral de tipo II con 64 aminoácidos en el VSRh-A y 65 en el VSRh-B. Se inserta en la envoltura viral como una proteína de membrana integral con un único dominio transmembrana, atravesando la bicapa lipídica una sola vez, con un extremo N-terminal citoplasmático y un C-terminal extracelular (Collins & Mottet, 1993).

Desde el punto de vista estructural, la proteína SH puede ensamblarse en oligómeros, principalmente pentámeros, capaces de formar canales iónicos (Figura 5) (Carter et al., 2010). Cada monómero presenta una hélice α -N-terminal coplanar a la membrana, conectada con una hélice transmembrana y un giro β -C-terminal. Al ensamblarse, los cinco monómeros generan un canal con simetría de cinco o seis subunidades, de unos 45 Å de longitud y un diámetro mínimo de 3.5 Å, con estructura tipo “*embudo*”. Esta configuración permite la conducción de cationes no selectivos en condiciones de pH ácido, característica propia de las vioporinas (Nieva et al., 2012).

Aunque no participa directamente en la entrada viral, la proteína SH modula la respuesta inflamatoria del hospedero al interferir con la señalización apoptótica y la activación de NF- κ B (Bohmwald et al., 2016; Carter et al., 2010; Fuentes et al., 2007). Estudios con virus recombinantes Δ SH demostraron que su ausencia no impide la replicación en cultivo celular, aunque reduce la eficiencia replicativa y el tamaño de las placas (Bukreyev et al., 2012); por lo tanto a SH se considera un factor accesorio de virulencia, no esencial para la replicación, pero relevante en la modulación de la respuesta del hospedero y potencial blanco antiviral debido a su función como vioporina.

Por su parte, la proteína SH del MPVh está compuesta por 179 a 183 aminoácidos, lo que la convierte en la más grande dentro de la familia de los *pneumovirus* (Masante et al., 2014;

van den Hoogen et al., 2002). Posee un dominio transmembrana central, un extremo N-terminal citoplasmático y un C-terminal extracelular, configuración similar a la descrita para el VSRh, aunque con diferencias en longitud y grado de glicosilación (Masante et al., 2014; Olmsted & Collins, 1989). Al igual que la proteína SH del VSRh, la SH del MPVh presenta la capacidad de oligomerizarse a través de su dominio transmembrana (TMD), formando complejos multiméricos con actividad tipo vioporina, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana celular y puede influir en la fusión mediada por la proteína F (Madan et al., 2010). Asimismo, se ha propuesto que la SH del MPVh inhibe la activación del factor NF- κ B en células epiteliales respiratorias (Bao, Kolli, et al., 2008) , contribuyendo a la modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero y a la patogenicidad viral.

La SH del MPVh puede considerarse un factor accesorio de virulencia, no esencial para la replicación, pero implicado en la homeostasis iónica y en la regulación de la respuesta inmune del hospedero, características compartidas con otras vioporinas del género *Metapneumovirus* y *Orthopneumovirus*.

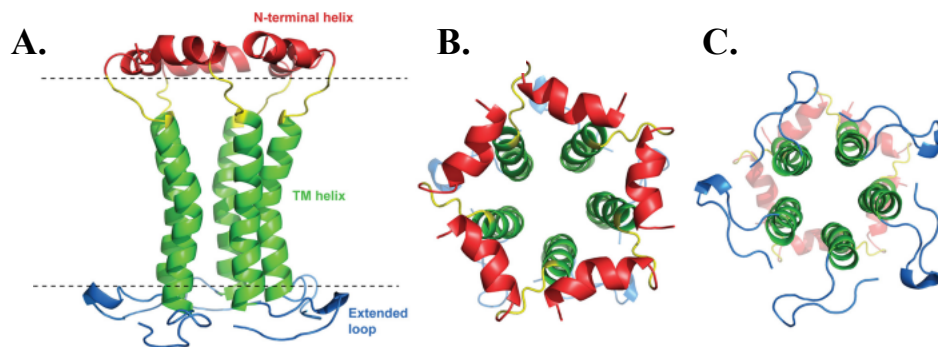


Figura 5. Arquitectura estructural del pentámero de la proteína SH del VSRh (Gan et al., 2012). (A) Vista lateral del pentámero de SH, mostrando la organización típica de vioporina: una hélice transmembrana central (verde) insertada en la bicapa lipídica y una hélice N-terminal orientada paralelamente a la superficie de la membrana (rojo), conectadas mediante un lazo C-terminal flexible (azul). (B) Vista superior del canal pentamérico, donde se observa el lumen central hidrofóbico que caracteriza a las vioporinas. (C) Vista inferior de la misma estructura, resaltando la disposición simétrica de las subunidades que generan un poro estrecho capaz de conducir iones en condiciones fisiológicas.

3.3 COMPLEJO DE REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN: N, P, L Y M2-1

Las proteínas N, P y L, junto con el ARN viral, conforman el complejo de replicación y transcripción (VR complex), responsable de la síntesis del genoma y de los ARN mensajeros en VSRh y MPVh. A este sistema se integra el factor antiterminación M2-1, esencial para la elongación eficiente de los transcritos. El VR complex, conservado en *Pneumoviridae*, se organiza en cuerpos de inclusión citoplasmáticos (inclusion bodies, IBs), donde se concentra la maquinaria necesaria para la replicación viral y la modulación de la respuesta inmune del hospedero. (Bohmwald et al., 2016; Pan et al., 2020; Thompson et al., 2023; Van Royen et al., 2022). A continuación, se describen las proteínas y el mecanismo de replicación y transcripción del VSRh y del MPVh, destacando aquellos procesos caracterizados inicialmente en VSRh y que posteriormente sirvieron como referencia para el estudio del MPVh.

3.3.1 PROTEÍNA N (NUCLEOPROTEÍNA)

La proteína N de VSRh consta de 391 aminoácidos, envuelve estrechamente el genoma y el antígenoma formando nucleocápsides helicoidales (Van Royen et al., 2022). Cada monómero de N recubre una porción definida del ARN, impidiendo la formación de estructuras bicatenarias (Figura 1 y 6) (Bohmwald et al., 2016). Esta organización mantiene el ARN accesible al complejo polimerasa y facilita la replicación y transcripción (Bohmwald et al., 2016; Van Royen et al., 2022)

La N del VSRh también participa en la formación de los IBs, donde interactúa con las proteínas M, P y L (Bohmwald et al., 2016). Estos IBs actúan como fábricas virales donde se concentran los componentes del VR complex (Van Royen et al., 2022). Además, la N contribuye a la evasión del sistema inmune al secuestrar proteínas señalizadoras innatas,

dificultando el reconocimiento del ARN viral y reduciendo la activación de interferones (Thornhill & Verhoeven, 2020).

En el MPVh, la nucleoproteína (N), de aproximadamente 394 aminoácidos, cumple funciones estructurales y replicativas similares a su homóloga en VSRh, formando parte del complejo ribonucleoproteico responsable de la replicación y transcripción viral (Figura 6) (van den Hoogen et al., 2002). De manera análoga, se organiza sobre el genoma de ARN permitiendo su correcta utilización por el complejo polimerasa (Pan et al., 2020). Durante la infección, participa en la formación de IBs en asociación con la proteína P, y se ha descrito que fragmentos derivados de N pueden contribuir a la activación de respuestas defensivas del hospedero (Garg et al., 2025).

En términos funcionales, desempeña un papel esencial en la estabilidad de la ribonucleoproteína y en la organización del complejo replicativo viral.

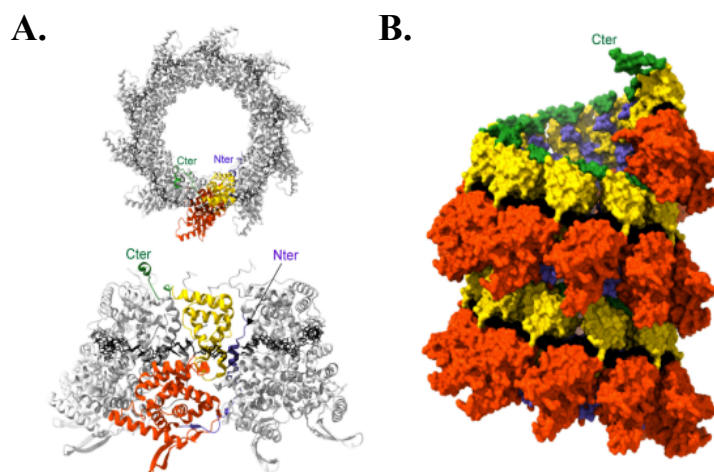


Figura 6. Organización estructural de la nucleoproteína (N) y del complejo N-ARN en Pneumovirus (Decool et al., 2021). (A) Vistas superior y lateral de anillos del VSRh formados por 10 monómeros de la proteína N ensamblados alrededor del ARN viral. Cada monómero se muestra con un código de color para distinguir sus regiones: naranja y amarillo representan dominios centrales de N, mientras que azul y verde indican los extremos N- y C-terminales. El ARN se visualiza en negro, evidenciando su alojamiento en el surco de la proteína. (B) Modelo helicoidal del complejo N-ARN, donde múltiples subunidades de N (superficie coloreada) se ensamblan de manera continua para formar la nucleocápside helicoidal, estructura esencial que mantiene el ARN protegido pero accesible al complejo polimerasa.

3.3.2 PROTEÍNA P (FOSFOPROTEÍNA)

La proteína P de VSRh es de 241 aminoácidos, actúa como un cofactor esencial del complejo polimerasa y como un adaptador estructural que enlaza a N, L y M2-1, estabilizando las interacciones del VR complex (Collins et al., 2013; Lu et al., 2002). Es una proteína homotetramérica y una de las más fosforiladas del VSRh, con más de 10-12 residuos modificados por quinasas y fosfatasas celulares (Collins et al., 2013; Lu et al., 2002). La fosforilación es crítica para su función, ya que su inhibición o mutación reduce drásticamente la replicación viral (Lu et al., 2002). Adicionalmente, P funciona como chaperona de N, uniéndose a los monómeros libres para evitar su autoagregación o su unión inespecífica al ARN celular, asegurando que solo el ARN viral recién sintetizado sea encapsidado (Collins et al., 2013).

En cuanto al MPVh, la fosfoproteína P, de aproximadamente 294 aminoácidos, es más larga que su homóloga del VSRh y cumple funciones análogas como cofactor esencial de la polimerasa L y nodo de interacción molecular entre distintos componentes del complejo de replicación (Pan et al., 2020; van den Hoogen et al., 2002).

En el complejo L-P se observa una disposición tentacular, donde los cuatro protómeros del tetramero adoptan conformaciones distintas (Figura 7 y 8), lo que permite estabilizar la polimerasa L y posicionar la forma monomérica de N (N₀) cerca del canal de salida del ARN para su encapsidación inmediata (Pan et al., 2020).

Asimismo, P media la unión de L a la nucleocápside (complejo N-ARN) y mantiene a N en su estado libre (N₀) mediante su función de chaperona molecular, evitando el autoensamblaje prematuro hasta el inicio de la replicación (Renner et al., 2016). Además, se ha demostrado que P contribuye a la evasión inmune al reducir la inducción de interferón tipo I, al limitar la capacidad de RIG-I de detectar ARN viral con extremo 5'-trifosfato (Garg et al., 2025).

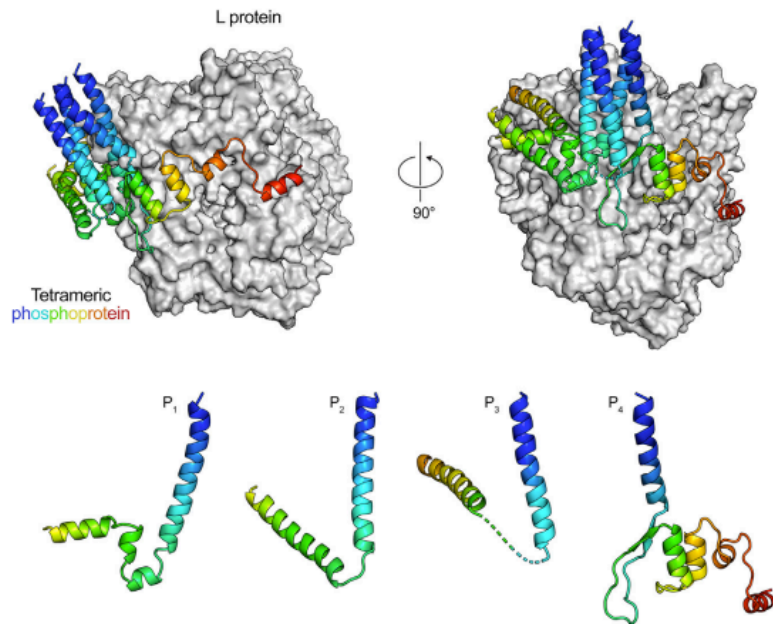


Figura 7. Organización del tetrámero de la proteína P del VSRh y su interacción con la polimerasa L (Gilman et al., 2019). La proteína L (gris) se muestra en dos orientaciones separadas por un giro de 90°, rodeada por el tetrámero de la fosfoproteína P, cuyos monómeros aparecen coloreados en un gradiente del azul al rojo según la dirección N→C. La disposición “tentacular” de P permite que cada monómero adopte una conformación distinta para estabilizar la enzima y coordinar el posicionamiento de la N_0 durante la replicación. En la parte inferior se representan individualmente los cuatro monómeros P₁-P₄, resaltando sus diferencias estructurales dentro del ensamblaje tetrámero.

3.3.3 PROTEÍNA L (LARGE POLYMERASE SUBUNIT)

La proteína L de VSRh, es de aproximadamente 2165 aminoácidos (Figura 8), constituye la ARN polimerasa dependiente de ARN responsable de la síntesis de los transcriptos virales (Bohmwald et al., 2016; Collins et al., 2013). Dado que el genoma del VSRh es de sentido negativo, la L reconoce un promotor en el extremo 3' y, con la ayuda de P, inicia la transcripción secuencial de los genes virales (Bohmwald et al., 2016; Collins et al., 2013). Durante la replicación, L copia el ARN genómico negativo para generar una cadena complementaria de sentido positivo (antigenoma), que sirve como molde para producir nuevas copias genómicas negativas (Bohmwald et al., 2016). Estas nuevas cadenas son encapsuladas inmediatamente por N, asegurando la estabilidad del material genético antes de su empaquetamiento en viriones maduros.

En cuanto al MPVh, la proteína L es de aproximadamente 2005 aminoácidos, es ligeramente más corta que su homóloga del VSRh y cumple funciones análogas como ARN polimerasa dependiente de ARN, responsable de la transcripción y replicación del genoma viral (Heim et al., 2025; van den Hoogen et al., 2002). Presenta una organización modular característica de los Mononegavirales, con dominios de polimerasa (RdRp), capping (PRNTase) y metiltransferasa (MTase), que actúan de manera coordinada en la síntesis y maduración del ARN (Figura 8) (Heim et al., 2025; Pan et al., 2020). La interacción con la fosfoproteína P es esencial para la estabilidad y funcionalidad de la enzima, al permitir el posicionamiento de la nucleoproteína N₀ cerca del canal de salida del ARN para su encapsidación (Pan et al., 2020).

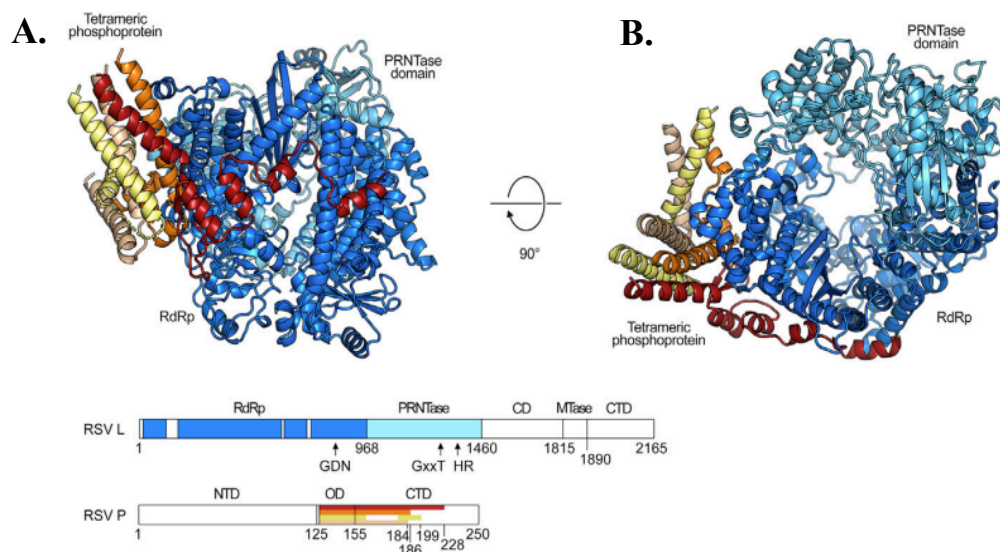


Figura 8. Organización estructural de la ARN-polimerasa L de VSRh en complejo con la fosfoproteína P (Gilman et al., 2019). (A) Vista lateral del complejo L-P del virus sincitial respiratorio humano (VSRh). La proteína L se muestra en tonos azules e integra los dominios de ARN-polimerasa (RdRp) y polirribonucleotidiltransferasa (PRNTase). Cada monómero del tetramero de P se presenta en un color cálido distinto, evidenciando su modo de interacción con L. (B) Vista superior del mismo complejo, donde se aprecia la disposición tetramérica de P alrededor de los dominios catalíticos de L. Debajo se incluyen los esquemas lineales de L y P indicando los dominios resueltos estructuralmente. Esta organización es similar a la descrita para otros miembros de *Pneumoviridae*, incluido el MPVh.

3.3.4 PROTEÍNA M2-1

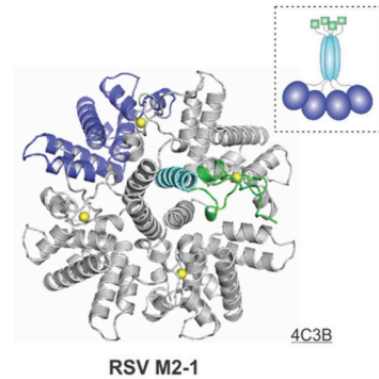
La proteína M2-1 en VSRh es de 194 aminoácidos y es un factor de elongación transcripcional dentro del VR complex (Bohmwald et al., 2016; Tran et al., 2009). Favorece la progresión de la L a lo largo del genoma, evitando la terminación prematura de los ARNm virales. Existen formas fosforiladas y no fosforiladas de M2-1, ambas capaces de unirse al ARN y a las proteínas L y P (Tran et al., 2009). La interacción con N depende del ARN viral, como lo demuestra la disociación de este complejo tras el tratamiento con RNasas (Bohmwald et al., 2016). M2-1 actúa en forma tetramérica (Figura 9), siendo esta oligomerización indispensable para su función; los virus mutantes incapaces de formar tetrameros muestran defectos severos en la transcripción (Bohmwald et al., 2016). Asimismo, M2-1 puede activar la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B), induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias y quimioquinas que participan en la respuesta inmunitaria (Reimers et al., 2005).

Para el MPVh, la proteína M2-1 es de aproximadamente 187 aminoácidos y también actúa como un factor de elongación transcripcional que evita la terminación prematura de los ARNm virales (Heim et al., 2025; Herfst et al., 2004; van den Hoogen et al., 2002). Al igual que en el VSRh, se ha descrito que la M2-1 del MPVh favorece la progresión de la polimerasa L a lo largo del molde genómico y, de forma transitoria, se asocia con la fosfoproteína P, posiblemente regulando el equilibrio entre replicación y transcripción (Heim et al., 2025; Pan et al., 2020). Además, se ha señalado que dominios específicos de M2-1 pueden inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos, sugiriendo un papel adicional en la activación inmune durante la infección por MPVh (Garg et al., 2025).

A.



B.



C.



Figura 9. Organización estructural de la proteína M2-1 en *Pneumoviridae* (Cao et al., 2021). (A) Representación lineal de la organización modular de M2-1, compuesta por un dominio de unión a zinc (ZBD), un dominio de oligomerización (OD) y un dominio central (CD). (B) Estructura cristalográfica del tetrámero de M2-1 del VSRh, que muestra su ensamblaje característico y la disposición espacial de los dominios que permiten su función como factor de elongación transcripcional. (C) Estructura cristalográfica del tetrámero de M2-1 del MPVh, con una organización general homóloga a la del VSRh, consistente con su papel conservado en la transcripción viral.

3.4 PROTEÍNA DE ENSAMBLAJE: M (MATRIZ)

La proteína M de VSRh es de 256 aminoácidos y cumple un papel esencial en la morfogénesis y ensamblaje del virión, además de participar en la regulación de la replicación (Bohmwald et al., 2016; Collins et al., 2013). En fases tempranas de la infección, M se localiza transitoriamente en el núcleo, donde suprime la transcripción de genes del hospedero y modula la expresión celular (Bian et al., 2012; Collins et al., 2013). Posteriormente se redistribuye al citoplasma, asociándose con los IBs y las glicoproteínas de superficie G y F para coordinar el ensamblaje de viriones (Bohmwald et al., 2016).

La proteína M también interactúa con M2-1 dentro del VR complex, contribuyendo al acoplamiento entre replicación y empaquetamiento (Bohmwald et al., 2016). Durante la maduración de los viriones, M participa en la formación y elongación de los filamentos virales, que actúan como precursores del virión infeccioso. En ausencia de M, los filamentos

se mantienen inmaduros e inestables, confirmando su papel indispensable en la morfogénesis (Mitra et al., 2012).

En el MPVh, la proteína M, de aproximadamente 254 aminoácidos, cumple funciones estructurales equivalentes, constituyendo el componente matricial que organiza el ensamblaje del virión al enlazar el complejo ribonucleoproteico con la envoltura viral (van den Hoogen et al., 2002). Forma una capa submembranal que actúa como andamiaje interno y coordina la asociación del genoma encapsidado con las glicoproteínas F y G, facilitando la gemación y liberación de las partículas virales maduras (Heim et al., 2025; van den Hoogen et al., 2002). Al igual que en el VSRh, cumple un papel esencial en la morfogénesis y replicación viral, y su asociación transitoria con los IBs sugiere una función adicional en el transporte y la maduración intracelular de los componentes virales (Heim et al., 2025). Además, se ha descrito que la proteína M del MPVh puede liberarse en forma soluble por células infectadas, promoviendo la secreción de citocinas inflamatorias, lo que sugiere un papel adicional en la modulación del microambiente inmunológico (Garg et al., 2025).

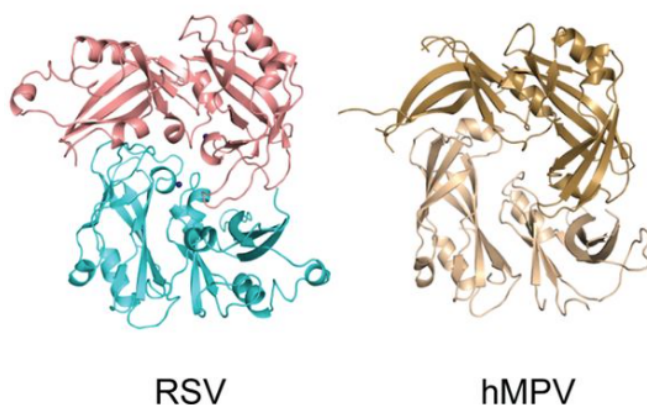


Figura 10. Estructura dimérica de la proteína M en *Pneumoviridae* (Förster et al., 2015). (A) VSRh: Dímero de la proteína M, que tapiza la cara interna de la envoltura viral y es esencial para la morfogénesis. Estudios de crio-tomografía revelan que M se organiza en una malla submembranal de dímeros; cuando su dimerización se altera, el virus no logra ensamblar viriones ni partículas tipo virión (VLPs). (B) MPVh: Dímero de la proteína M, cuya arquitectura conserva el modo de dimerización observado en VSRh, en concordancia con su función matricial equivalente dentro de los *Pneumoviridae*.

3.5 PROTEÍNA REGULADORA: M2-2

La proteína M2-2 de VSRh es de 88-90 aminoácidos, se expresa en bajos niveles durante la infección y cumple un papel regulador en el equilibrio entre replicación y transcripción (Collins et al., 2013). Aunque su función como componente del virión no está completamente esclarecida, los virus recombinantes deficientes en M2-2 muestran replicación retardada y menos eficiente del ARN viral (X. Cheng et al., 2005). Se ha propuesto que M2-2 modula la actividad de la polimerasa L, actuando como un conmutador molecular que reduce la transcripción cuando el virus requiere priorizar la replicación genómica para la producción de viriones (X. Cheng et al., 2005).

En el MPVh, la proteína M2-2 es de aproximadamente 71-90 aminoácidos, y similar a VSRh se expresa en niveles bajos durante la infección y cumple una función reguladora en el equilibrio entre transcripción y replicación (Heim et al., 2025; Herfst et al., 2004). También similarmente a su homóloga del VSRh, actúa como un modulador negativo de la síntesis de ARNm, promoviendo la transición hacia la replicación del genoma una vez que se ha alcanzado una cantidad suficiente de proteínas estructurales (Heim et al., 2025). La ausencia o inactivación de M2-2 provoca un aumento en la transcripción de genes virales y una disminución en la producción de genomas completos, lo que evidencia su papel como interruptor molecular dentro del ciclo de replicación. Este mecanismo contribuye a coordinar la maduración de los viriones y a mantener la eficiencia replicativa del virus en las fases tardías de la infección (Heim et al., 2025).

Se ha propuesto que la ausencia de M2-2 provoca un aumento en la generación de genomas defectivos (DIs), los cuales son potentes activadores del interferón tipo I. Así, la activación de la respuesta antiviral no se debería a una acción antagonista directa de M2-2 sobre las vías del interferón, sino al desequilibrio replicativo que incrementa la producción de DIs (Groen

et al., 2022; Heim et al., 2025). Además, estudios con virus quiméricos demostraron que la M2-2 de MPVh no reemplaza la función antagonista de las proteínas NS1/NS2 de VSRh, lo que confirma que no actúa como un antagonista robusto del interferón en condiciones fisiológicas (Heim et al., 2025; Ribó-Molina et al., 2025).

4. CLASIFICACIÓN

4.1 VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

El VSRh se ha clasificado históricamente en dos subgrupos principales, A y B (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985), dentro de cada subgrupo existe una variabilidad antigénica y genética adicional, siendo la glicoproteína G la que presenta la mayor diversidad, desempeñando un papel central en la patogenicidad y en los mecanismos de evasión inmune del virus (Jha et al., 2016). En años recientes, esta clasificación ha evolucionado desde un enfoque basado exclusivamente en el gen G (Peret et al., 1998) hacia un sistema filogenético integral sustentado en genomas completos, con el propósito de unificar criterios taxonómicos y reflejar con mayor precisión la diversidad genética del VSRh a nivel global (J. Chen et al., 2022; Goya et al., 2024; Ramaekers et al., 2020). La propuesta más reciente se encuentra sustentada en análisis de genomas completos y marcadores de aminoácidos, que organiza las secuencias de VSRh-A en 24 linajes y de VSRh-B en 16 linajes (Goya et al., 2024). Este sistema incorpora la duplicación característica del gen G (72nt en A.D y 60nt en B.D), reemplazando la nomenclatura histórica de genotipos como ON1 y BA (Eshaghi et al., 2012; Trento et al., 2003), y ofrece un marco robusto, reproducible y actualizable para la vigilancia molecular global del VSRh. Este marco estandarizado facilita la comparabilidad entre estudios, la integración de datos provenientes de diferentes regiones y la comprensión de los procesos de reemplazo de linajes y de la presión inmunitaria que modulan la variabilidad

global del virus. Además, esta clasificación ha sido adoptada por plataformas de análisis genómico como Nextclade RSV (<https://clades.nextstrain.org/>) y se encuentra respaldada por un repositorio público en GitHub que reúne las definiciones filogenéticas, secuencias de referencia y marcadores aminoacídicos para su aplicación y actualización continua (<https://github.com/rsv-lineages>).

4.2 METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Desde su caracterización inicial, los aislamientos de MPVh se agruparon en dos serotipos principales, A y B, cada uno subdividido en dos linajes genéticos: A1, A2, B1 y B2 (Van den Hoogen et al., 2004). Esta clasificación constituyó la base del sistema actualmente aceptado, sustentado en análisis filogenéticos de los genes F y G, que reflejan las principales diferencias evolutivas y antigénicas del virus.

En años posteriores, y con el incremento de secuencias disponibles, el linaje A2 fue objeto de una subdivisión adicional en A2a y A2b (Huck et al., 2006). Algunos estudios describieron además un posible linaje A2c, aunque análisis comparativos demostraron que las cepas clasificadas bajo esta denominación correspondían realmente a una rama interna de A2b, la cual posteriormente se reorganizó en A2b1 y A2b2 (Nao et al., 2020a; Nidaira et al., 2012). Este refinamiento respondió a la necesidad de unificar criterios taxonómicos y evitar duplicidades en la nomenclatura de los sublinajes descritos en distintas regiones geográficas. Recientemente, un análisis filogenómico exhaustivo basado en genomas completos y secuencias del gen F (Groen et al., 2023) propuso un sistema revisado y estandarizado que sustituye las denominaciones previas por un esquema jerárquico más coherente: A1, A2.1, A2.2.1, A2.2.2, B1 y B2. En este modelo, los antiguos sublinajes A2a y A2b se corresponden con A2.1 y A2.2, respectivamente, mientras que A2b1 y A2b2 (o A2c) se redefinen como A2.2.1 y A2.2.2 (Groen et al., 2023). Esta propuesta incorpora además criterios cuantitativos

basados en distancias genéticas dentro y entre linajes, con el fin de armonizar la clasificación a nivel internacional.

Entre los linajes emergentes, A2.2.2 ha adquirido especial relevancia epidemiológica debido a la aparición de variantes que presentan duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos en el gen G, detectadas por primera vez a mediados de la década de 2010 (Piñana et al., 2017; Saikusa et al., 2017). Un estudio posterior postuló que la variante con duplicación de 111nt podría haber surgido de una forma ancestral con duplicación de 180nt, que experimentó a su vez una delección parcial, apoyando un modelo evolutivo de duplicación-delección del gen G (Goya et al., 2025). El linaje A2.2.2 representa actualmente uno de los linajes más dinámicos y predominantes del MPVh, consolidando el modelo evolutivo que integra la diversidad genética con las adaptaciones estructurales del gen G.

La evolución de la clasificación del MPVh refleja una transición desde un enfoque serológico hacia un sistema filogenético integral, que reconoce la complejidad evolutiva del virus y permite una mejor comprensión de sus patrones de circulación, reemplazo de linajes y potenciales implicaciones en la inmunidad y el desarrollo de vacunas.

5. EPIDEMIOLOGÍA

5.1 PREVALENCIA GLOBAL Y REGIONAL

El VSRh sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial, especialmente en menores de cinco años. Se estima que causa alrededor de 33 millones de LRTI al año, con 3.6 millones de hospitalizaciones y casi 100,000 muertes en niños menores de 5 años, de las cuales más del 90% ocurren en países de ingresos bajos y medianos (Laudanno et al., 2020; Y. Li et al., 2022; Shi et al., 2022). En las Américas, los datos integrados de vigilancia del SARInet Plus Network (2010-2019) muestran que el VSRh

fue detectado en 3.1% de más de 14 millones de muestras respiratorias, con una marcada variabilidad estacional según latitud y clima (Couto et al., 2025).

De forma paralela, el MPVh representa una causa importante de infección respiratoria tanto en niños como en adultos mayores, con una carga anual estimada de 640,000 hospitalizaciones en menores de cinco años y cerca de 470,000 en adultos mayores de 65 años, lo que refleja su creciente impacto sanitario en poblaciones vulnerables (Adepoju et al., 2025; Kulkarni et al., 2025). Se estima que contribuye entre 4-13% de las hospitalizaciones por infecciones respiratorias bajas en niños menores de 5 años, lo que refuerza su relevancia como patógeno respiratorio a nivel global (Principi et al., 2025; Wang et al., 2021).

5.2 VARIACIONES ESTACIONALES

Los patrones estacionales del VSRh en el continente americano presentan una progresión de sur a norte, con picos invernales en regiones templadas y estacionalidad menos definida en zonas tropicales (Couto et al., 2025). En Sudamérica, la circulación inicia en mayo y alcanza su máximo entre julio y agosto; en el Caribe comienza alrededor de septiembre y culmina en octubre-noviembre; y en Centroamérica, el inicio promedio ocurre a mediados de julio, extendiéndose hasta noviembre (Figura 11) (Couto et al., 2025).

De manera similar, el MPVh muestra una estacionalidad parcialmente solapada con la del VSRh, con picos de actividad que suelen ocurrir pocas semanas después (Jobe et al., 2025). En regiones tropicales de América Latina, su circulación se asocia a la temporada lluviosa, con aumentos coincidentes con altos niveles de humedad y transmisión (Cuevas et al., 2003; Evelyn et al., 2019; Vidal et al., 2019).

Durante la pandemia de COVID-19, los patrones estacionales tradicionales se alteraron, la implementación de medidas no farmacológicas redujo la transmisión de VSRh y MPVh en

2020, seguida de picos atípicos y brotes intensificados cuando las restricciones fueron levantadas (Agha & Avner, 2021; Goya, Sereewit, et al., 2023; Jobe et al., 2025; Ujiie et al., 2021)



Figura 11. Estacionalidad del VSRh en las Américas (Couto et al., 2025). Patrones de circulación epidémica de VSRh (en rojo) a lo largo de las semanas epidemiológicas del año, estimados mediante el método de curva promedio de la OMS a partir de datos de vigilancia 2010-2019. La figura muestra diferencias claras entre subregiones, con temporadas invernales bien definidas en zonas templadas del norte y del sur, y una circulación más prolongada o menos marcada en países tropicales del Caribe y Centroamérica, reflejando el gradiente estacional característico del continente

5.3 TRANSMISIÓN

Tanto el VSRh como MPVh se transmiten principalmente por contacto directo con secreciones respiratorias infectadas, a través de la mucosa nasal, oral o conjuntival. La transmisión también puede ocurrir mediante gotas respiratorias de corto alcance y, en menor medida, por aerosoles finos ($<5 \mu\text{m}$) o fómites contaminados, donde los virus pueden permanecer viables durante varias horas. En entornos hospitalarios, los procedimientos que generan aerosoles (como aspiración o intubación) incrementan el riesgo de diseminación (C. H. Cheng et al., 2020; Siegel et al., 2007).

Ambos virus presentan alta transmisibilidad en espacios cerrados, especialmente en guarderías, escuelas y hogares, y su propagación se ve favorecida por condiciones ambientales como la humedad elevada, las bajas temperaturas y el hacinamiento (Mohammadi et al., 2025).

5.4 PATRÓN DE CIRCULACIÓN Y LINAJES DETECTADOS

5.4.1 VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

La dinámica de circulación del VSRh refleja la interacción entre la estacionalidad y la evolución genética de sus linajes. Históricamente, los genotipos ON1 (subgrupo A) y BA (subgrupo B) se consolidaron como los dominantes a nivel global desde su emergencia en 2010 y 1999, respectivamente, caracterizados por duplicaciones de 72 y 60 nucleótidos en la segunda región hipervariable del gen G, lo que favoreció su rápida diseminación y el reemplazo progresivo de variantes previas (Eshaghi et al., 2012; Trento et al., 2003). Estudios realizados en Panamá entre 2008 y 2012 documentaron la circulación del genotipo ON1, derivada del genotipo GA2 del subgrupo A, junto con la emergencia local de un nuevo genotipo del subgrupo B (BA14), evidenciando la coexistencia temprana de ambos linajes dominantes en el país (Ábrego et al., 2017; Trento et al., 2015).

Con la adopción de la clasificación genómica reciente basada en secuencias completas, los antiguos genotipos ON1 y BA se redefinen dentro de los denominados linajes descendientes (Descendant Lineages), clasificados como A.D.1-A.D.5, incluyendo sus subvariantes, para el subgrupo A, y como B.D.1-B.D.4 para el subgrupo B, del cual se derivan los linajes secundarios B.D.E.1-B.D.E.4 (Goya et al., 2024). Durante los últimos años, los análisis de vigilancia molecular han evidenciado la co-circulación de múltiples linajes, con un predominio alternante de los subgrupos A y B según la temporada y la región geográfica

(Tabor et al., 2020; Yu et al., 2019) A nivel mundial, los linajes A.D.1, A.D.3 y A.D.5 se mantienen como los más frecuentes dentro del subgrupo A, mientras que B.D.E.1 se ha consolidado como el linaje predominante del subgrupo B durante 2023-2025 (Iglesias-Caballero et al., 2023; Rice et al., 2025; Tramuto et al., 2024; Yunker et al., 2024).

5.4.2 METAPNEUMOVIRUS HUMANO

La vigilancia molecular del MPVh ha mostrado una co-circulación persistente de los linajes A y B, con reemplazos graduales y alternancia en su predominio a lo largo del tiempo (Ábrego et al., 2018; Goya et al., 2025; Groen et al., 2023). En Panamá, durante 2010-2012, se identificaron los sublinajes A2a, A2b, B1 y B2, con predominio del A2b, reflejando una elevada diversidad genética temprana en el país (Ábrego et al., 2018). En años posteriores a nivel global, y con la aplicación de la clasificación genómica basada en secuencias completas, se observó una transición progresiva dentro del linaje A2 hacia variantes que, bajo el nuevo esquema, corresponden al sublinaje A2.2.2 (Groen et al., 2023). Este grupo se asocia con la aparición de cepas portadoras de duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos en el gen G, inicialmente reportadas en Japón y España y posteriormente detectadas en distintas regiones del mundo (Groen et al., 2023; Piñana et al., 2017; Saikusa et al., 2017). Aunque estas variantes no se relacionaron con un aumento de virulencia, parecen haber adquirido ventajas adaptativas que favorecieron su expansión y reemplazo de genotipos previos (Lee et al., 2025). Actualmente, los sublinajes A2.2.2 (111dup) y B2 constituyen los principales grupos circulantes a nivel mundial, como se evidenció en los brotes recientes de 2023-2025 en Taiwán y Estados Unidos (Goya et al., 2025; Lee et al., 2025).

6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad por VSRh varían según la edad y el estado inmunitario del paciente, aunque los síntomas iniciales suelen ser similares. En lactantes, la infección comienza con congestión nasal leve a moderada, fiebre baja y tos productiva (Kaler et al., 2023). En los primeros días puede progresar hacia bronquiolitis, neumonía o laringotraqueítis (Jha et al., 2016), con signos como sibilancias, retracciones costales, taquipnea y, en menores de seis meses, apnea o dificultad respiratoria (Kaler et al., 2023). En cuadros más graves se observan hipoxemia, deshidratación y necesidad de ventilación mecánica (Jha et al., 2016). Las complicaciones neurológicas (apnea central, letargia, estrabismo) y las pulmonares (infiltrados, atelectasias, hiperinsuflación) son comunes en cuadros severos y pueden dejar secuelas respiratorias a largo plazo, como sibilancias o asma persistente (Figura 12) (Eisenhut, 2006; Jha et al., 2016).

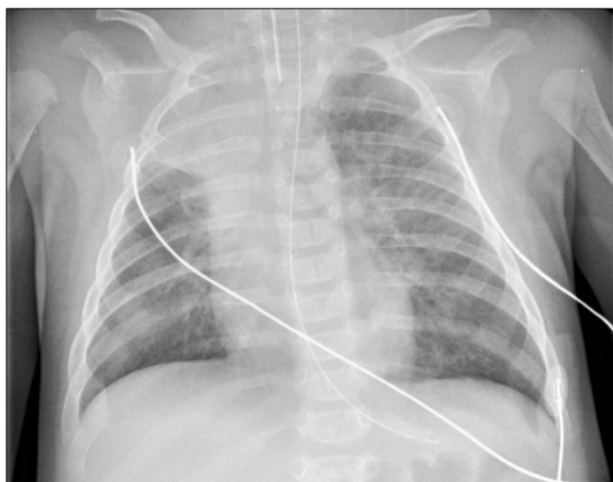


Figura 12. Hallazgos radiológicos en bronquiolitis severa por VSRh (Jha et al., 2016). Radiografía de tórax en lactantes que muestra sobreinsuflación pulmonar, engrosamiento peribronquial bilateral y zonas de atelectasia, hallazgos propios de infección grave por VSR.

En adultos mayores, el cuadro clínico es similar pero con evolución más grave y compromiso del tracto respiratorio inferior (Jha et al., 2016). En esta población, el deterioro inmunitario y la disminución de la función pulmonar aumentan la susceptibilidad a complicaciones como

neumonía, exacerbaciones de EPOC, insuficiencia cardíaca y crisis asmáticas (Falsey & Walsh, 2000).

En pacientes inmunocomprometidos, el curso clínico suele iniciar con síntomas del tracto respiratorio superior y progresar hacia enfermedad del tracto inferior, con elevada morbilidad y mortalidad; las complicaciones dependen del grado de inmunosupresión, siendo más graves en receptores de trasplante de médula ósea (Falsey, 2008; Jha et al., 2016).

De forma similar al VSRh, las manifestaciones clínicas del MPVh son variables y dependen de la edad y el estado inmunitario del huésped. En niños pequeños, la infección suele iniciar con fiebre, tos, hipoxia y signos de infección de vías respiratorias superiores, pudiendo progresar hacia bronquiolitis, bronquitis o neumonía (Boivin et al., 2003). Las sibilancias son frecuentes y se asocian con infecciones del tracto respiratorio inferior (Williams et al., 2005), pudiendo presentarse otitis media en hasta la mitad de los casos pediátricos (Williams et al., 2005). Al igual que el VSRh, el MPVh puede exacerbar asma en niños y adultos y agravar cuadros de EPOC en pacientes con enfermedad pulmonar crónica (Panda et al., 2014).

En adultos jóvenes, las reinfecciones generalmente se manifiestan como cuadros leves tipo resfriado o gripe, mientras que en adultos mayores pueden evolucionar a formas graves con neumonitis e incluso desenlace fatal (Falsey et al., 2003). En pacientes inmunocomprometidos, especialmente receptores de trasplante de médula ósea o de pulmón, el MPVh puede causar neumonía severa, con alta morbilidad y mortalidad (Panda et al., 2014).

En resumen, el MPVh ocasiona un espectro clínico semejante al del VSRh, que va desde infecciones respiratorias leves hasta enfermedad pulmonar grave potencialmente fatal en lactantes, ancianos e individuos inmunodeprimidos.

7. FACTORES DE RIESGO PARA INFECCIÓN GRAVE

Los principales factores asociados con la severidad del VSRh y MPVh incluyen variables demográficas, clínicas, ambientales y genéticas.

- **Edad y sexo:** los lactantes menores de seis meses representan el grupo más vulnerable para ambas infecciones, con el mayor riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria baja grave. En el caso del MPVh, la mayor carga de hospitalizaciones también se concentra en niños menores de dos años. Diversos estudios han señalado al sexo masculino como un factor de riesgo adicional asociado a mayor severidad (Hall et al., 2009; Mohammadi et al., 2025; Simoes, 2003).
- **Prematuridad y comorbilidades:** La prematuridad y las cardiopatías congénitas o enfermedades pulmonares crónicas aumentan significativamente el riesgo de hospitalización y mortalidad por VSRh, patrón similar observado en MPVh, donde también influyen condiciones neurológicas, metabólicas (diabetes, obesidad) y cardiovasculares. En adultos mayores, la inmunosenescencia y las comorbilidades respiratorias (EPOC, asma) o cardíacas se asocian con mayor severidad (Bhattacharya et al., 2025; Hall et al., 2009; Mohammadi et al., 2025).
- **Inmunocompromiso:** pacientes con cáncer hematológico, infección por VIH o receptores de trasplantes de pulmón o médula ósea presentan un riesgo sustancial de progresión hacia enfermedad respiratoria baja grave y mortalidad elevada, particularmente en MPVh, donde la linfopenia, el uso de corticoides y las coinfecciones bacterianas o fúngicas agravan el desenlace (Mohammadi et al., 2025).
- **Factores ambientales y socioeconómicos:** La exposición al humo de tabaco y determinantes como la malnutrición, el hacinamiento y el acceso limitado a atención

médica en contextos de bajos recursos se asocian con mayor riesgo de infección grave y desenlaces adversos (Bhattacharya et al., 2025; Simoes, 2003).

- Carga viral y coinfecciones: aunque los resultados de distintos estudios son contradictorios, se ha observado que las infecciones por el subgrupo A tanto en VSRh como en MPVh pueden presentar cargas virales más elevadas, sin que ello implique diferencias significativas en la gravedad clínica. Por otra parte, las coinfecciones virales, especialmente con influenza, coronavirus estacionales o SARS-CoV-2 y bacterianas (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) se asocian a una mayor severidad clínica, prolongación de la hospitalización y necesidad de soporte ventilatorio. (McGinley et al., 2022; Moe et al., 2017; Mohammadi et al., 2025).

En contraste, variables como el bajo nivel educativo y la ausencia de lactancia materna no han mostrado una asociación consistente con un mayor riesgo de enfermedad grave ni con la necesidad de hospitalización, particularmente en el caso del VSRh (Simoes, 2003).

8. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

El diagnóstico de VSRh y MPVh se basa en métodos de cultivo, detección de antígenos y técnicas moleculares, aunque la Academia Americana de Pediatría (AAP) no recomienda su uso rutinario para la bronquiolitis, que debe diagnosticarse principalmente por evaluación clínica (Ralston et al., 2014). No obstante, la confirmación de laboratorio permite evitar el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro, aplicar medidas de control de infecciones y planificar el alta (Jha et al., 2016). El cultivo viral, aunque preciso y útil para tipificación y estudios de sensibilidad, tiene un tiempo de respuesta prolongado (3-7 días) y requiere laboratorios especializados con líneas celulares como HEp-2 para VSRh y LLC-MK2 para MPVh (Asseri, 2025; Panda et al., 2014). Los métodos de detección antigénica, como la

inmunofluorescencia directa (DFA) o las pruebas rápidas (RADT), ofrecen resultados en menos de una hora con sensibilidad de 80-90% frente al cultivo, pero su rendimiento disminuye fuera de la temporada pico y en adultos con baja carga viral (Asseri, 2025; Jha et al., 2016). Tanto para VSRh como para MPVh, los métodos moleculares, en especial la RT-PCR y sus variantes en tiempo real, son actualmente las técnicas de referencia por su alta sensibilidad, rapidez y capacidad para detectar coinfecciones incluso con cargas virales bajas (Alfano et al., 2024; Jha et al., 2016; Panda et al., 2014). Desde hace una década, los ensayos multiplex RT-PCR (mRT-PCR) ofrecen una herramienta más sensible y rápida, con valores de sensibilidad y especificidad cercanos al 100% (Bharaj et al., 2009; Zhang et al., 2015). La automatización y la disponibilidad creciente de pruebas multiplex están transformando el diagnóstico de ambos virus al permitir la detección simultánea de múltiples patógenos respiratorios con alta precisión (Zhang et al., 2015).

9. ESTRATEGIAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS: AVANCES Y PERSPECTIVAS

9.1 VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

Los esfuerzos terapéuticos frente al VSRh se han enfocado en el desarrollo de anticuerpos monoclonales, vacunas y antivirales de molécula pequeña. Aunque estas estrategias han mostrado avances importantes, persisten desafíos relacionados con su eficacia y duración de protección, lo que hace necesario continuar investigando con datos provenientes de distintas regiones y poblaciones. A continuación, se presenta una síntesis de las principales estrategias preventivas y terapéuticas disponibles o en desarrollo frente al VSRh:

9.1.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAbs)

Los mAbs representan una de las principales herramientas de prevención frente a las formas graves de infección por VSRh, especialmente en poblaciones de alto riesgo. La proteína de fusión (F), altamente conservada en VSRh, constituye el blanco fundamental de la respuesta de anticuerpos neutralizantes que confieren protección frente al virus.

9.1.1.1 PALVIZUMAB

El descubrimiento y aprobación del palivizumab en 1998, representó el primer gran hito terapéutico en la historia del VSRh (Group, 1998). Este anticuerpo, producido en células de mieloma murino mediante tecnología de ADN recombinante, actúa bloqueando la entrada del virus a las células huésped a través de su actividad de inhibición de la fusión sobre el sitio antigénico II de la proteína F (Figura 4), confiriendo así una inmunidad pasiva de corta duración (Harkensee et al., 2006). Su uso profiláctico se orientó a neonatos prematuros y niños con cardiopatías congénitas o displasia broncopulmonar, reduciendo significativamente la tasa de hospitalización (Group, 1998). Sin embargo, las limitaciones derivadas del alto costo, la necesidad de dosis mensuales y su indicación restringida, motivaron el desarrollo de nuevas estrategias de inmunoprofilaxis de larga duración (Carbonell-Estrany et al., 2025).

9.1.1.2 MOTAVIZUMAB

Motavizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de segunda generación, derivado de palivizumab (Cingoz, 2009), diseñado para mejorar su potencia y duración. Al igual que su predecesor, se une al sitio antigénico II de la proteína F (Figura 4). Motavizumab difiere de palivizumab en 13 residuos de aminoácidos, presentando una capacidad neutralizante considerablemente mayor (Mejías et al., 2005). En modelos experimentales, demostró reducir los títulos virales pulmonares entre 50 y 100 veces más que su predecesor (O'Brien

et al., 2015). A partir de este anticuerpo, se desarrolló una nueva variante denominada MEDI-557, mediante la sustitución de tres aminoácidos (M252Y/S254T/T256E) en la región Fc, lo que prolongó su vida media sérica aproximadamente cuatro veces respecto a motavizumab (Dall'Acqua et al., 2006).

Entre 2004 y 2010, ocho ensayos clínicos evaluaron la eficacia y seguridad de motavizumab, principalmente en lactantes sanos o de alto riesgo (Sevendal et al., 2024). Aunque mostró una reducción significativa de hospitalizaciones en algunos estudios, en general no evidenció una mejora clínica sustancial frente a palivizumab, motivo por el cual no fue aprobado por la FDA (Sevendal et al., 2024).

10.1.1.3 NIRSEVIMAB

Nirsevimab fue desarrollado a partir del anticuerpo parental MEDI8897*, optimizado mediante la incorporación de la mutación YTE en la región Fc para prolongar su vida media sérica y mejorar su estabilidad (Zhu et al., 2017). Este anticuerpo monoclonal de nueva generación se une con alta especificidad al sitio antigénico Ø (Figura 4), ubicado en el ápice de la proteína F en su conformación pre-F, región crítica para el proceso de fusión del virus con la célula huésped, lo que le confiere una potente capacidad neutralizante frente a los subgrupos A y B de VSRh (Zhu et al., 2017). Como resultado de estas modificaciones estructurales, nirsevimab alcanza una vida media sérica prolongada (85-117 días), aproximadamente tres veces mayor que la de palivizumab (Griffin et al., 2017).

En los ensayos clínicos, una única dosis de nirsevimab redujo significativamente la incidencia de infecciones del tracto respiratorio inferior y las hospitalizaciones asociadas al VSRh durante un período de 150 días, equivalente a una temporada epidémica completa. El fármaco mostró un perfil de seguridad favorable, sin reportes de reacciones alérgicas relevantes, y demostró alta eficacia tanto frente al subgrupo A como al subgrupo B del virus

(Griffin et al., 2020). Una ventaja importante frente a palivizumab es que requiere una sola dosis por temporada, en lugar de cinco aplicaciones mensuales, lo que reduce significativamente los costos y simplifica su administración.

Nirsevimab fue aprobado recientemente por la FDA, consolidándose como una de las principales estrategias de inmunoprofilaxis pasiva de larga duración frente al VSRh (Jones, 2023).

9.1.1.4 CLESROVIMAB (MK-1654)

Clesrovimab es derivado del anticuerpo monoclonal parental RB1* (Tang et al., 2019), también cuenta con la mutación YTE (Dall'Acqua et al., 2006), localizadas en la región Fc. Clesrovimab se une al sitio antigénico IV de la proteína de fusión (F) (Figura 4) (Tang et al., 2019), el cual difiere de los sitios de unión de los anticuerpos palivizumab/motavizumab (sitio II) y nirsevimab (sitio Ø). El sitio IV está presente tanto en la conformación pre-F como en la post-F de la proteína F, mientras que el sitio Ø solo se encuentra en la conformación pre-F (Graham, 2017).

La disponibilidad de anticuerpos frente al VSRh que reconocen diferentes epítomos de unión podría contribuir a reducir el riesgo de resistencia viral. Los estudios de vigilancia han demostrado que el sitio IV se encuentra altamente conservado (Hause et al., 2017; Mas et al., 2018), lo que lo convierte en un objetivo profiláctico atractivo, ya que dicha conservación disminuye el potencial de escape viral. Un análisis de más de 15,000 secuencias de los subgrupos A y B del VSRh depositadas en GenBank mostró que el epítomo de unión de clesrovimab se mantiene con una identidad del 99.8% (Fridman et al., 2025)

Los ensayos clínicos realizados entre 2017 y 2022 confirmaron que clesrovimab presenta un perfil de seguridad favorable, sin diferencias significativas en la incidencia de eventos

adversos frente al placebo. Aunque no mostró una eficacia profiláctica superior, su desarrollo clínico continúa en fase 3, con resultados previstos para 2026 (Sevendal et al., 2024).

9.1.1.5 ANTICUERPOS DE NUEVA GENERACIÓN DESCONTINUADOS

Entre 2014 y 2018, el anticuerpo monoclonal Gontivimab (ALX-0171*), dirigido contra el sitio II de la proteína F, demostró una potente actividad neutralizante in vitro, superior a la de palivizumab (Detalle et al., 2016). En tres ensayos clínicos controlados con placebo en lactantes hospitalizados con infección respiratoria baja, la administración inhalada durante tres días consecutivos redujo significativamente la carga viral y el tiempo para alcanzar niveles indetectables, sin embargo, no se observaron mejoras clínicas relevantes, por lo que su desarrollo se interrumpió tras la fase 2 (Sevendal et al., 2024).

De forma similar, Suptavumab (REGN-2222*), un anticuerpo dirigido al sitio antigénico V de la proteína F (Figura 4), mostró mayor potencia neutralizante que palivizumab en modelos in vitro y animales (Chintha et al., 2014). Sin embargo, no demostró eficacia profiláctica en un ensayo fase 3 en lactantes prematuros, y la aparición de mutaciones de escape en cepas del subgrupo B llevó a la suspensión de su desarrollo clínico (Simões et al., 2021).

9.1.2 VACUNAS

Paralelamente al desarrollo de nuevos mAbs, también se retomó el desarrollo vacunal con un enfoque racional, impulsado por los avances en el diseño de inmunógenos y en las plataformas de administración (Alandijany & Qashqari, 2025). El aprovechamiento de la estructura de la proteína F en su conformación pre-F, la forma más inmunogénica del antígeno, permitió el diseño de vacunas capaces de inducir potentes respuestas neutralizantes en la mucosa respiratoria, superando una de las principales limitaciones históricas: la baja

inmunidad protectora conferida por la infección natural por VSRh en adultos sanos (Yamin et al., 2016).

Estos avances tecnológicos culminaron con la aprobación por parte de la FDA de múltiples vacunas contra el VSRh, marcando un hito en la prevención de la enfermedad. Entre ellas destacan Arexvy® (GlaxoSmithKline), Abrysvo® (Pfizer) y mResvia® (Moderna), autorizadas recientemente para su uso en adultos mayores y, en el caso de Abrysvo®, también para inmunización materna (Alandijany & Qashqari, 2025; Alfano et al., 2024; FDA, 2024a).

A continuación, se describen las principales plataformas vacunales actualmente en evaluación para la prevención del VSRh, incluyendo vacunas vivas atenuadas, de subunidades proteicas y de ARNm:

9.1.2.1 VACUNAS VIVAS ATENUADAS

En niños y lactantes, las vacunas vivas atenuadas ofrecen ventajas sobre las no replicantes, ya que la inmunización intranasal puede generar una respuesta inmune local y sistémica capaz de bloquear la infección respiratoria. Diversos candidatos desarrollados mediante adaptación al frío, mutagénesis química o ingeniería genética han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos (Jorquera et al., 2013). Entre ellos destacan los prototipos desarrollados por el NIAID/NIH, en colaboración con Sanofi (actualmente en fase 3) y Codagenix (en fase 1), que utilizan cepas atenuadas por deleciones en genes no estructurales para inducir inmunidad protectora sin provocar enfermedad (PATH, 2025).

9.1.2.2 VACUNAS DE SUBUNIDADES PROTEICAS

Las vacunas basadas en proteínas purificadas o fragmentos peptídicos del VSRh se caracterizan por su seguridad y alta inmunogenicidad, especialmente en poblaciones de riesgo como adultos mayores e individuos inmunocomprometidos (Vartak & Sucheck, 2016).

Las formulaciones más avanzadas utilizan la proteína F estabilizada en su forma pre-F,

responsable de inducir una potente respuesta neutralizante (McLellan, Chen, Joyce, et al., 2013). Entre ellas destacan Arexvy® (GSK) y Abrysvo® (Pfizer), ambas aprobadas por la FDA en 2023. Arexvy® combina la proteína F pre-F con el adyuvante AS01E, mientras que Abrysvo® es una vacuna bivalente indicada para adultos mayores y vacunación materna, con eficacia demostrada en la prevención de hospitalizaciones neonatales (Sun et al., 2024). Además, otros candidatos en desarrollo avanzado, como los de Clover Biopharma, Daiichi Sankyo, Maxvax y Advaccine Biotechnology, exploran el uso de las proteínas F o G del VSRh como antígenos principales, así como plataformas basadas en partículas o nanopartículas virales, con resultados preliminares alentadores en fases clínicas intermedias (PATH, 2025).

9.1.2.3 VACUNAS mRNA

Las vacunas de ARN mensajero constituyen un hito reciente en la inmunización moderna (Pardi et al., 2018). Tras décadas de investigación, los avances en la estabilización del ARN, el uso de nucleótidos modificados y nanopartículas lipídicas (LNPs) permitieron desarrollar una plataforma segura y adaptable (Gote et al., 2023; Martinon et al., 1993). Su eficacia se demostró durante la pandemia de COVID-19 con las vacunas Comirnaty® (Pfizer-BioNTech) y Spikevax® (Moderna), consolidando la tecnología mRNA como base para nuevas vacunas profilácticas (Gote et al., 2023).

Tras el éxito de esta plataforma frente a SARS-CoV-2, la tecnología mRNA se ha extendido al desarrollo de vacunas contra el VSRh. El candidato mRNA-1345 de Moderna, recientemente aprobado como mResvia™, codifica la proteína F del VSRh en su conformación de pre-F, lo que induce una respuesta robusta de anticuerpos neutralizantes altamente protectores (Gote et al., 2023). Los ensayos clínicos de fase 3 en adultos mayores demostraron una eficacia del 55-58 % en la prevención de infección confirmada por VSRh y

una respuesta inmunogénica sostenida hasta 12 meses, con un perfil de seguridad comparable al de las vacunas proteicas subunitarias Arexvy® (GSK) y Abrysvo® (Pfizer) (Alandijany & Qashqari, 2025). Estos resultados posicionan a las vacunas de ARN mensajero como una estrategia prometedora para la prevención del VSRh y otras infecciones respiratorias emergentes.

9.1.3 ANTIVIRALES

Actualmente, la ribavirina es el único antiviral aprobado por la FDA contra el VSRh. Sin embargo, su eficacia limitada, toxicidad y el requerimiento de equipos especiales para administrarla restringen su uso (Ohmit et al., 1996). A pesar de décadas de investigación y miles de compuestos evaluados, no se dispone aún de antivirales realmente efectivos. Las líneas actuales de desarrollo buscan nuevos blancos terapéuticos e inhibidores que interfieran con proteínas virales o con factores del hospedero esenciales para la replicación, una estrategia que podría conducir a tratamientos más eficaces contra el VSRh (Sun et al., 2024). En la tabla I se resumen los principales antivirales en investigación contra el VSRh, incluyendo sus mecanismos de acción, fase de desarrollo clínico y observaciones sobre eficacia y seguridad reportadas en estudios recientes:

Tabla I. Resumen de antivirales en desarrollo contra el VSRh

Antiviral	Mecanismo de acción	Tipo de molécula	Fase clínica	Observaciones	Referencia
Ribavirina	Análogo de nucleósido (inhibe la síntesis de ARN viral)	Pequeña molécula	Aprobado (uso limitado)	Único antiviral aprobado por la FDA; eficacia limitada y alta toxicidad.	(Sun et al., 2024)
EDP-938 (Enanta)	Nucleoproteína (inhibidor post-replicación)	Pequeña molécula oral	Fase IIb - En curso	Disminuye >90% la carga viral en modelos animales; buena	(Sevendal et al., 2024; Sun et al., 2024)

				tolerancia y PK favorable.	
AK0529 / Ziresovir (ArkBio)	Proteína F (inhibidor de fusión)	Pequeña molécula oral	Fase III - En curso	Reduce carga viral y duración de síntomas en lactantes.	(Sevendal et al., 2024)
MCC950	Inflamasoma NLRP3 (modulador inmune)	Pequeña molécula	Preclínico	Reduce inflamación pulmonar y citocinas (IL-1 β , IL-33, CCL2) en modelos murinos.	(Sun et al., 2024)
A3E / Cyclopamina / CPM	Inclusiones virales (condensate-hardening)	Esteroides modificados	Preclínico	Endurece condensados citoplasmáticos; inhibe replicación y reduce inflamación en ratón.	(Sun et al., 2024)
Tricostatina A (TSA) / SAHA	Inhibidor de histona desacetilasa (HDAC)	Pequeña molécula	Preclínico	Limita replicación del VRS vía activación de IFN tipo I; disminuye daño tisular.	(Sun et al., 2024)

A pesar de los avances recientes, varios candidatos antivirales fueron discontinuados tras mostrar eficacia limitada o efectos adversos en fases clínicas. Entre ellos destacan Presatovir (GS-5806) y Rilematovir (JNJ-53718678), ambos inhibidores de la proteína F que no lograron reducir la carga viral en pacientes hospitalizados; Lumicitabine (ALS-8176), retirado por toxicidad hematológica y hepática; ALN-RSV01, un ARN de interferencia que no demostró beneficio clínico significativo; y PC786, un inhibidor inhalado de la polimerasa L cuyo desarrollo fue suspendido tras completar estudios de fase II sin resultados concluyentes (Sevendal et al., 2024; Sun et al., 2024).

9.2 METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Actualmente no existen vacunas ni terapias antivirales aprobadas contra el MPVh. Las principales líneas de investigación incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína F, vacunas experimentales basadas en plataformas recombinantes o de ARN mensajero y antivirales de molécula pequeña con actividad *in vitro* (Garg et al., 2025; Principi et al., 2025). Aunque algunos candidatos han mostrado resultados prometedores en modelos preclínicos, ninguno ha avanzado a fases clínicas avanzadas, lo que evidencia la necesidad de continuar desarrollando estrategias preventivas y terapéuticas más eficaces (Principi et al., 2025). A continuación, se presenta una síntesis de las principales estrategias preventivas y terapéuticas actualmente en desarrollo frente al MPVh:

9.2.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAbs)

Similar al VSRh, los mAbs representan una de las estrategias más prometedoras para la prevención y el tratamiento de las infecciones por MPVh (Guo et al., 2023). La proteína F de ambos virus comparte una identidad de secuencia del 33-36 % y una elevada conservación estructural tridimensional, especialmente en los dominios funcionales y en los epítomos de los sitios III y IV (Mas et al., 2018). Estas similitudes, junto con la eficacia demostrada de los mAbs frente a la proteína F del VSRh (Sun et al., 2024), han impulsado el desarrollo de anticuerpos dirigidos a epítomos conservados del MPVh, predominantemente en los sitios III y IV, donde se concentra más del 50 % de los mAbs neutralizantes de alta potencia descritos hasta la fecha (Guo et al., 2023). Este enfoque busca generar mAbs con actividad de neutralización cruzada frente a distintos pneumovirus, lo que constituye una estrategia prometedora para el control de infecciones respiratorias por virus relacionados (Guo et al., 2023).

9.2.1.1 MPE8

MPE8 es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce la conformación pre-F de la proteína F en el sitio antigénico III (Figura 4), compartido por MPVh y VSRh. Presenta una potente actividad neutralizante in vitro y protección completa en modelos animales frente a ambos virus (Corti et al., 2013). Actualmente se encuentra en fase preclínica, y su capacidad de unión a una región altamente conservada lo convierte en un modelo de referencia para el desarrollo de futuros mAbs multivalentes (Principi et al., 2025).

9.2.1.2 54G10

54G10 se une a la proteína F del MPVh, específicamente al sitio antigénico IV (Figura 4), mostrando afinidad subnanomolar y fuerte actividad neutralizante en modelos de ratón BALB/c y ratas alodoneras (Schuster et al., 2015). Su potencial de neutralización cruzada frente a MPVh y VSRh lo posiciona como un candidato prometedor, aunque su desarrollo permanece en fase preclínica (Principi et al., 2025).

9.2.1.3 ADI-61026 Y OTROS ANTICUERPOS EN DESARROLLO

Entre los candidatos más recientes destacan ADI-61026, dirigido al sitio Ø, ADI-61104 (sitios I y III) y ADI-61556 (sitios II y III), todos con elevada actividad neutralizante en modelos animales y reducción significativa de los títulos virales pulmonares (Rappazzo et al., 2022). Solo ADI-61026 y ADI-61556 lograron reducir también la carga viral nasal, lo que sugiere diferencias en su aplicabilidad profiláctica o terapéutica. Estos anticuerpos continúan en fase preclínica (Principi et al., 2025; Rappazzo et al., 2022).

Otros anticuerpos de interés incluyen Ds7 y ADI-61104, ambos dirigidos al sitio antigénico I y con potente capacidad de neutralización frente al MPVh (Bar-Peled et al., 2019; Wen et al., 2012). Asimismo, 25P13 se une al sitio III, mostrando actividad de neutralización cruzada frente a VSRh y MPVh. De forma más reciente, los anticuerpos MPV467 y M4B06, que

interactúan con los sitios II y V y con la forma post-F de la proteína F, respectivamente, han demostrado una fuerte actividad neutralizante en modelos animales (Banerjee et al., 2022; Xiao et al., 2022). Todos estos candidatos permanecen en fase preclínica, sin que ninguno haya avanzado aún a estudios clínicos en humanos (Principi et al., 2025).

A diferencia del VSRh, cuyos mAbs más eficaces se dirigen a epítomos exclusivos de la conformación pre-F (sitios Ø y V), en MPVh los epítomos más conservados y funcionalmente estables se localizan en los sitios III y IV (Guo et al., 2023; Principi et al., 2025). Esta característica respalda el desarrollo futuro de anticuerpos humanizados con alta afinidad por regiones conservadas, neutralización cruzada entre subgrupos y vida media prolongada, buscando alcanzar el impacto clínico obtenido con los anticuerpos de nueva generación frente diferentes pneumovirus (Sevendal et al., 2024).

9.2.2 VACUNAS

El desarrollo de vacunas frente al MPVh ha transitado un camino paralelo al del VSRh, pasando de los enfoques iniciales con formulaciones inactivadas hacia plataformas más modernas que buscan inducir respuestas inmunes seguras y duraderas. Dada su estrecha relación genética y estructural con otros pneumovirus, se han considerado estrategias de inmunización combinada que podrían conferir protección cruzada dentro de este grupo viral (PATH, 2025; Russell et al., 2018).

9.2.2.1 VACUNAS VIVAS ATENUADAS

Las vacunas vivas atenuadas frente al MPVh han mostrado resultados variables (Principi et al., 2025). Aunque no son recomendables en personas inmunocomprometidas por el riesgo de reversión a la virulencia, en niños sanos pueden inducir una respuesta inmune sólida y equilibrada sin necesidad de adyuvantes ni riesgo de *vaccine-associated immune*

enhancement (Anderson et al., 2013; Kim et al., 1969). Los primeros candidatos, obtenidos mediante pasajes seriados en cultivo, mostraron escasa inmunogenicidad en humanos, posiblemente debido al efecto modulador de la proteína G y otras proteínas inmunomoduladoras (Herfst et al., 2008). Posteriormente, se desarrollaron versiones recombinantes con reemplazo de los genes P o N por homólogos de metapneumovirus aviar, que evidenciaron buena inmunogenicidad en modelos animales, aunque una respuesta insuficiente en lactantes seronegativos durante un ensayo fase 1 (NCT01255410) (Karron et al., 2018; Pham et al., 2005). Entre los candidatos más prometedores destaca Metavac®, vacuna bivalente viva atenuada que incorpora el gen F del VSRh sobre un contexto de MPVh y confiere protección cruzada frente a ambos virus; su ensayo clínico fase 1 está programado para 2026 (Vaxxel, 2024). Asimismo, se han explorado vacunas quiméricas basadas en vectores virales como BPIV3, PIV5, NDV o SeV, con resultados alentadores en animales, aunque aún sin estudios clínicos en humanos (Ogonczyk Makowska et al., 2020).

9.2.2.2 VACUNAS DE SUBUNIDADES PROTEICAS

En paralelo al desarrollo de vacunas frente al VSRh, se han creado diversos candidatos de subunidades dirigidos al MPVh, con la proteína de fusión (F) como principal objetivo inmunógeno (Principi et al., 2025). Para potenciar la respuesta inmune y minimizar los riesgos de reactogenicidad, se han probado distintas formulaciones, entre ellas fragmentos proteicos purificados, partículas similares a virus (VLPs), LNPs y proteínas combinadas con adyuvantes. Las VLPs son estructuras de escala nanométrica que exhiben antígenos virales en su conformación nativa, sin poseer material genético infeccioso (Tariq et al., 2022).

Entre los prototipos más avanzados figura IVX-A12, una vacuna bivalente de subunidades que incorpora los trímeros pre-F de RSV y MPVh formulados en dos VLPs. En un ensayo clínico fase 1 (NCT05664334) con adultos sanos de 60-75 años, esta vacuna generó

respuestas humorales robustas frente a ambos virus sin eventos adversos significativos. A los 28 días, los títulos de anticuerpos neutralizantes se incrementaron 3-4 veces para RSVh y 4-5 veces para MPVh, manteniéndose elevados por al menos 12 meses (Shapiro et al., 2025). Dichos resultados se confirmaron posteriormente en un ensayo fase 2, y el candidato ha sido calificado como preparado para fase 3, tras recibir la designación Fast Track de la FDA (Icosavax, 2023; PATH, 2025). No obstante, no se han realizado aún estudios en población pediátrica.

Otro candidato prometedor es VXB-241, una vacuna combinada RSV/MPVh que utiliza una tecnología de “*molecular clamp*” para estabilizar las proteínas F en su conformación pre-F (Wijesundara et al., 2020). Se prevé la ejecución de un ensayo multicéntrico fase 1 en adultos mayores, con una fase inicial en adultos jóvenes (NCT06556147) (Principi et al., 2025). Además, un candidato experimental compuesto por trómeros de F en conformación pre-F diseñados mediante inteligencia artificial ha demostrado notable actividad de neutralización cruzada y protección casi completa frente al desafío con MPVh en modelos de rata algodónera (Bakkers et al., 2024).

9.2.2.3 VACUNAS mRNA

El desarrollo de vacunas de ARNm frente al MPVh se ha centrado en plataformas capaces de codificar múltiples antígenos y generar protección combinada frente a distintos virus respiratorios (Principi et al., 2025). Uno de los principales candidatos, mRNA-1365, expresa las proteínas F del VSRh y del MPVh (en su conformación pre-F); sin embargo, su ensayo clínico en lactantes (NCT05743881) fue suspendido tras detectarse episodios de enfermedad respiratoria severa, similares a los observados con la vacuna mRNA-1345, lo que llevó a pausar temporalmente los programas de desarrollo basados en esta plataforma (FDA, 2024b).

En contraste, mRNA-1653, que combina antígenos del MPVh y del virus parainfluenza tipo 3 (PIV3), ha mostrado resultados alentadores. Fue seguro e inmunogénico en adultos (August et al., 2022) y, en un ensayo fase 1b (NCT03392389) en niños de 12 a 59 meses, aumentó significativamente los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a ambos virus tras una sola dosis, apoyando la posibilidad de un esquema de inmunización única (Schnyder Ghamloush et al., 2024).

Otros candidatos formulados con LNPs, dirigidos exclusivamente al MPVh o combinando MPVh/VSRh, se encuentran actualmente en fases clínicas avanzadas (NCT06237296) (Sanofi, 2025).

9.2.3 ANTIVIRALES

A la fecha, no existen antivirales aprobados específicamente para el tratamiento del MPVh (Principi et al., 2025). Los primeros esfuerzos se centraron en reutilizar fármacos empleados contra otros virus respiratorios, particularmente ribavirina, que mostró actividad en estudios in vitro y en modelos animales, aunque su uso clínico se limita a reportes aislados con resultados variables en pacientes inmunocomprometidos (Bonney et al., 2009; Shachor-Meyouhas et al., 2011).

En la tabla II se resumen los principales antivirales en investigación contra el MPVh, incluyendo sus mecanismos de acción, tipo de molécula, fase de desarrollo clínico y observaciones relevantes sobre eficacia y seguridad reportadas en estudios recientes:

Tabla II. Resumen de antivirales en desarrollo contra el MPVh

Antiviral	Mecanismo de acción	Tipo de molécula	Fase clínica	Observaciones	Referencias
Ribavirina	Inhibe la ARN polimerasa	Pequeña molécula	Reportes de caso	Actividad preclínica; eficacia clínica limitada	(Bonney et al., 2009; Garg et al., 2025)
Interferones (IFN- α/β , IFN- λ)	Inducen estado antiviral	Biológicos recombinantes	Preclínico	Efecto inhibitorio experimental; sin ensayos clínicos	(Acharya & Byraredddy, 2025)
Favipiravir	Análogo de purina	Pequeña molécula	Preclínico	Protección en hámsters; sin datos en humanos	(S. C. Wen & Williams, 2015)
Probenecid	Inhibe transportadores del hospedero	Pequeña molécula	Temprana (COVID-19)	Actividad amplia; sin estudios en MPVH	(Principi et al., 2025)
ALVR106	Linfocitos T específicos	Terapia celular	Fase 1/2	Seguro y reduce carga viral	(Nikiforow et al., 2024)

A pesar del amplio espectro de compuestos evaluados, la mayoría no ha progresado más allá de la fase preclínica debido a eficacia limitada, inestabilidad, toxicidad o dificultades de administración. Entre ellos destacan NMSO3, DAS181, péptidos de fusión derivados de la proteína F, heparinas modificadas y polisacáridos sulfatados, así como polímeros N-sulfonados (Principi et al., 2025). Aunque demostraron actividad robusta in vitro y en modelos animales, ninguno ha sido evaluado en ensayos clínicos específicos para MPVh. Actualmente, la única terapia en desarrollo clínico con resultados preliminares positivos es ALVR106, un enfoque inmunocelular dirigido a virus respiratorios en huéspedes inmunocomprometidos (Nikiforow et al., 2024).

9.3 SUSTITUCIONES AMINOACÍDICAS DE RELEVANCIA TERAPÉUTICA

La marcada variabilidad de la proteína G dificulta la generación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, mientras que la proteína F es considerablemente más conservada entre los subgrupos A y B, con más del 90 % de identidad aminoacídica, lo que la convierte en el principal objetivo para el diseño de vacunas y mAbs (Liljeroos et al., 2013; McLellan, Chen, Leung, et al., 2013). La vigilancia molecular ha identificado mutaciones relevantes en los sitios antigénicos de la F en ambos subgrupos (Duan et al., 2024). En VSRh A, estas sustituciones suelen ser de baja frecuencia (Ahani et al., 2023), mientras que en VSRh B aparecen con mayor regularidad y pueden modificar la antigenicidad y favorecer la evasión inmune (Anderson et al., 2013). Entre 2015 y 2021, el análisis de los sitios de unión de nirsevimab mostró ausencia de mutaciones en VSRh A y una frecuencia del 12% en VSRh B, destacando las mutaciones dobles I206M y Q209R (Ahani et al., 2023; Wilkins et al., 2023). Otras mutaciones repetidamente reportadas en VSRh B incluyen R42K, I64T, L172Q, S173L, S190N, K191R, S211N y S389P, mientras que en VSRh A se observan variantes como I57V, K68N, T122A, L204S/I, S276N, L381I, P389S y la doble A103T-T122A (Goya, Sereewit, et al., 2023; Tabor et al., 2020; Wilkins et al., 2023). Durante la cocirculación con COVID-19 se registró un aumento en S190N, S211N y S389P, seguido de R42K (Mazela et al., 2024). En cuanto a clesrovimab, estudios recientes indican que el sitio IV de la proteína F presenta una variabilidad muy baja en las cepas circulantes. En VSRh A se ha descrito la sustitución G446E, reconocida como una variante asociada a resistencia (Tang et al., 2019), junto con K433M, cuyo impacto en la neutralización permanece incierto. En VSRh B se han reportado además las sustituciones I432T, K445Q y V450I/F, todas con efecto aún no determinado sobre la actividad de clesrovimab (Wetzke et al., 2025).

Diversos estudios han demostrado que ciertos cambios en epítomos de la proteína F afectan la actividad neutralizante de mAbs (Ahani et al., 2023; Simões et al., 2021; Wilkins et al., 2023). Por ejemplo, S211N mantiene sensibilidad a nirsevimab, mientras que K68E en VSRh A y K68Q y N201T en VSRh B reducen su capacidad neutralizante (Ahani et al., 2023; Wilkins et al., 2023). Mutaciones como K272E y S275F confieren resistencia completa a palivizumab (Jo et al., 2021), mientras que L258E/K, N262D y S275H/R producen distintos grados de escape; en contraste, N276S, ampliamente distribuida, no afecta la respuesta a este anticuerpo (Jallow et al., 2023; Zhu et al., 2012). Además, las sustituciones L172Q y S173L en VSRh B confieren resistencia a suptavumab, lo que contribuyó al fracaso del ensayo clínico fase III de este anticuerpo (Simões et al., 2021). Estos hallazgos subrayan la necesidad de mantener una vigilancia genética continua de la proteína F y de monitorear mutaciones que puedan comprometer la eficacia de vacunas y mAbs.

Por otra parte, en el MPVh se han descrito muy pocas sustituciones en la proteína F con implicaciones terapéuticas. A diferencia de VSRh, no se han identificado mutantes de escape frente a anticuerpos ampliamente neutralizantes como MPE8, lo que sugiere que los cambios que comprometerían su unión son poco tolerados por el virus y podrían afectar su aptitud viral (Corti et al., 2013). No obstante, bajo presión de anticuerpos se ha documentado la sustitución Q434H como variante de escape frente al monoclonal 54G10; de forma interesante, esta sustitución no disminuye la afinidad de unión del anticuerpo, lo que apunta a alteraciones conformacionales de la proteína F como posible mecanismo de evasión (Kinder, 2020). Fuera de este hallazgo puntual, la evidencia disponible indica que la proteína F de MPVh mantiene una alta estabilidad genética, con ausencia de mutaciones recurrentes que comprometan la acción de las terapias basadas en anticuerpos, aunque la detección de variantes aisladas como Q434H refuerza la necesidad de continuar la vigilancia molecular.

10. SITUACIÓN ACTUAL EN PANAMÁ Y BRECHA DE CONOCIMIENTO

En Panamá, el VSRh y el MPVh presentan un patrón de transmisión sostenida en un contexto tropical, con circulación persistente a lo largo del año y aumentos estacionales durante el período lluvioso, lo que ha consolidado su relevancia como agentes etiológicos de infección respiratoria aguda en población pediátrica (Couto et al., 2025; Sáez-Llorens et al., 2025). En particular, el VSRh constituye la principal causa de infección respiratoria en lactantes en el país, con una incidencia estimada de 21 episodios por 100 personas-año y la mayor tasa de hospitalización entre los virus respiratorios detectados. Por su parte, el MPVh presenta una incidencia menor, cercana a 9 episodios por 100 personas-año, aunque con una contribución relevante a los casos hospitalizados (Azziz-Baumgartner, Duca, González, et al., 2022). Estos datos refuerzan la importancia de ambos virus como problemas prioritarios de salud pública en el contexto nacional.

En este marco epidemiológico, los estudios previos realizados en el país aportaron información relevante sobre la diversidad molecular de ambos virus, describiendo genotipos circulantes y su variabilidad temporal bajo esquemas de clasificación antiguos (Ábrego et al., 2017, 2018; Trento et al., 2015). No obstante, dichas caracterizaciones se basaron en regiones parciales del genoma, principalmente la región hipervariable del gen G en VSRh y genes estructurales en MPVh, lo que limita la resolución evolutiva frente a los estándares actuales sustentados en genomas completos y en la clasificación filogenómica internacional vigente. Actualmente, Panamá no dispone de series temporales extensas de genomas completos que permitan evaluar con precisión la circulación contemporánea, los patrones de reemplazo y la dinámica filodinámica de ambos virus bajo la nomenclatura actual. Esta brecha adquiere especial relevancia para VSRh en un escenario nacional marcado por la reciente implementación de estrategias de vacunación (MINSA, 2025) y por el uso emergente de

anticuerpos monoclonales de acción prolongada recientemente aprobados, dado que la ausencia de datos genómicos contemporáneos impide establecer una línea basal pre-intervención que permita evaluar, en el futuro, posibles cambios epidemiológicos y evolutivos en los linajes circulantes. Asimismo, en Panamá y en la región no se dispone de evidencia funcional local que evalúe el desempeño de cepas circulantes frente a los anticuerpos monoclonales aprobados, lo que limita la generación de información contextualizada sobre su potencial eficacia frente a la diversidad genética actualmente presente.

De manera similar, aunque aún no existan intervenciones inmunoproliféricas aprobadas contra MPVh, la falta de vigilancia genómica integral restringe la comprensión de su evolución reciente y de su comportamiento epidemiológico en el país.

En este contexto, y considerando el cambio de paradigma global hacia la vigilancia basada en genomas completos, resulta necesario fortalecer la vigilancia molecular en Panamá mediante la generación y análisis sistemático de genomas completos. Este enfoque permitirá integrar la epidemiología molecular nacional a los estándares filogenómicos internacionales y aportar evidencia de referencia tanto para el país como para la región. Sobre esta base se sustenta el planteamiento de la presente investigación.

HIPOTESIS

El análisis genómico de VSRh y MPVh en Panamá evidencia diversidad y reemplazo de linajes, siguiendo patrones evolutivos comparables a los descritos en otras regiones, mientras que las dianas esenciales para vacunas y tratamientos se mantienen conservadas, sin indicios de variantes con posible escape funcional.

OBJETIVOS GENERAL

Analizar la dinámica evolutiva del Virus Sincitial Respiratorio humano (VSRh) y Metapneumovirus humano (MPVh) circulantes en Panamá entre los años 2006 y 2024, y sus posibles implicaciones en vacunas y tratamientos en desarrollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar la secuenciación NGS y obtener genomas completos a fin de establecer un método de vigilancia genómica continua para estos virus en Panamá.
2. Realizar intentos de aislamiento de VSRh y MPVh en cultivos celulares a fin de mejorar la eficiencia y calidad de la secuenciación.
3. Evaluar posibles cambios asociados a escape inmunológico y terapéutico a través de análisis genómicos del VSRh y MPVh.
4. Comparar la dinámica evolutiva y transmisión de VSRh y MPVh en el tiempo con diferentes cepas reportadas a nivel mundial.
5. Evaluar antigénicamente la proteína F de VSRh circulantes en Panamá entre los años 2009 y 2023 a través de ensayos con anticuerpos monoclonales.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

DINÁMICA EVOLUTIVA Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VSRh EN PANAMÁ (2006–2024): CLASIFICACIÓN FILOGENÓMICA Y EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN ANTIGÉNICA FRENTE A ANTICUERPOS ANTI-F

Durante casi dos décadas, la evolución del VSRh ha estado marcada por procesos dinámicos de introducción, reemplazo de linajes y expansión de variantes con ventajas biológicas, inicialmente descritos bajo esquemas de clasificación basados en el gen G (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985; Peret et al., 1998) y más recientemente reinterpretados a la luz de la clasificación filogenómica sustentada en genomas completos (J. Chen et al., 2022; Goya et al., 2024; Ramaekers et al., 2020). En Panamá, el periodo 2006–2024 ofrece una ventana excepcional para analizar de manera continua estos procesos en un contexto tropical, abarcando tanto la transición hacia variantes con duplicaciones en G como la circulación contemporánea caracterizada mediante secuenciación genómica integral y la evaluación de la respuesta frente a anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína F. En este capítulo se presentan los resultados de estos análisis, orientados a caracterizar la dinámica evolutiva del VSRh en el país, su diversidad genómica y la conservación antigénica del virus.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Declaración de Ética

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá, Panamá (219/CBI/ICGES/22). Al tratarse de muestras de vigilancia epidemiológica y sin comprometer datos personales, no se requirió consentimiento ni asentimiento informado.

1.2 Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Panamá

La vigilancia de virus respiratorios en Panamá, establecida desde 1976 (Quiroz R et al., 1987), se realiza actualmente a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica para el Síndrome de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) y las Infecciones Respiratorias Agudas Graves (IRAG). Este sistema, administrado por el Ministerio de Salud, incluye 18 sitios centinela en todo el país: 8 para ETI y 10 para IRAG (Figura 13) (MINSA, 2017).

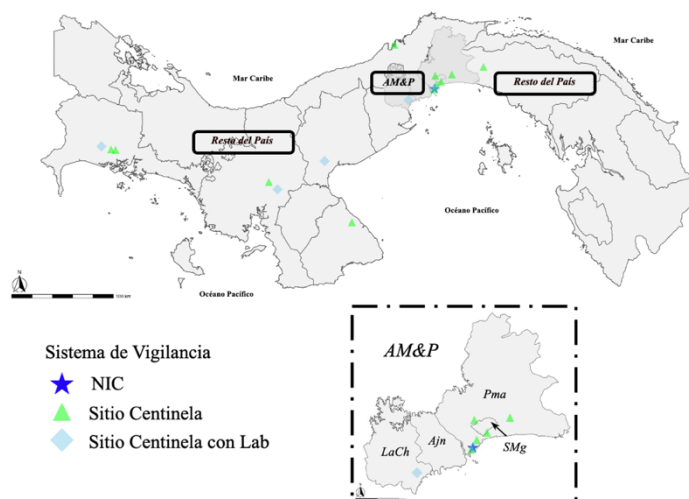


Figura 13. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de ETI e IRAG en Panamá. Localización de los 18 sitios centinela distribuidos en el país y del Centro Nacional de Influenza (NIC). El recuadro amplía el Área Metropolitana y Periferia (AM&P) en las que se incluyen los distritos densamente poblados de: Pma (Panamá), SMg (San Miguelito), Ajn (Arraiján) y LCh (La Chorrera).

Cada semana, los sitios centinela recolectan al menos cinco hisopados nasofaríngeos (HNF) de casos sospechosos de ETI e IRAG, los cuales se envían a los laboratorios centinela o al Centro Nacional de Influenza (NIC) en el Instituto Conmemorativo Gorgas en Ciudad de Panamá (MINSA, 2017). Este sistema busca garantizar la representatividad demográfica mediante la inclusión de muestras de todas las provincias del país, así como diversidad temporal con recolección continua durante toda la temporada, y diversidad poblacional mediante la inclusión de distintos grupos de edad y condiciones clínicas, abarcando tanto casos ambulatorios como hospitalizados (MINSA, 2017).

1.3 Muestras clínicas, extracción de ARN viral y RT-qPCR

Entre el 01 de enero de 2006 y al 31 de julio de 2024, se recuperaron retrospectivamente 542 muestras clínicas positivas para VSRh del biobanco del sistema de vigilancia, de estas 239 correspondían al periodo 2006-2017 y 303 al periodo 2018-2024 (Tabla III). El ARN total se extrajo utilizando el sistema KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, Rocklin, CA, USA), se confirmó la positividad a VSRh mediante RT-PCR en tiempo real (Kodani et al., 2011). Posteriormente, se seleccionaron 311 muestras con valores de $Ct < 28$, con el fin de asegurar una adecuada recuperación del genoma y proceder con la secuenciación completa. De estas 111 muestras corresponden al periodo 2006- 2017 y 200 muestras al periodo 2018-2024.

Tabla III. Características y distribución de muestras clínicas positivas para VSRh almacenadas en el biobanco del sistema de vigilancia, según período de circulación y variables demográficas de los pacientes en Panamá.

Características	Brotos Estacionales																				Total General (%)
	Periodo 2006-2017												Periodo 2018-2024								
	2006	2007	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total	2018	2019-20	2021	2022	2023	2024	Total		
No. de Muestras	9	6	36	20	21	25	23	21	33	25	20	239	25	76	15	65	64	58	303	542 (100)	
Género																					
Masculino			18	15	14	18	15	11	17	19	5	132	12	40	10	36	43	35	176	308 (56.8)	
Femenino			18	5	7	7	8	9	16	6	12	88	13	36	5	29	20	23	126	214 (39.5)	
S/D	9	6						1			3	19					1		1	20 (3.7)	
Estado Clínico																					
Hospitalizado			24	13	13	21	22	19	32	22	18	184	25	70	4	9	39	55	202	386 (71.2)	
Ambulatorio			6	7	7	4	1	2	1	3	2	33		5	11	56	22	3	97	130 (24.0)	
Fallecido												0		1					1	1 (0.2)	
S/D	9	6	6		1							22					3		3	25 (4.6)	
Edad del paciente																					
< 6m			24	10	9	13	11	12	21	13	10	123	12	32	3	14	12	18	91	214 (39.5)	
6 - 11m			4	4	3	2	7	5	5	6	3	39	10	23	1	16	16	12	78	117 (21.6)	
1 - 4a			7	6	5	6	2	3	7	4	6	46	3	20	8	27	24	26	108	154 (28.4)	
5 - 49a			1		3	4	1			1		10		1	2	6	9	2	20	30 (5.5)	
≥50a							2	1		1	1	5			1		3		4	9 (1.7)	
S/D	9	6			1							16				2			2	18 (3.3)	
Área Geográfica																					
AM&P			23	14	15	18	20	11	21	12	9	143	10	27	10	54	31	44	176	319 (58.9)	
Resto del País			12	6	6	7	3	10	11	13	11	79	15	49	5	11	33	13	126	205 (37.8)	
N/A	9	6	1						1			17						1	1	18 (3.3)	

Entre 2006 y 2024 se analizaron 542 muestras clínicas positivas para VSRh. La mayoría correspondió a pacientes hospitalizados (71.2%), seguidos de ambulatorios (24.0%) y un caso fallecido. Predominaron los pacientes masculinos (56.8%) y los menores de 6 meses (39.5%). El 58.9% de las muestras provinieron del Área Metropolitana y Periferia (AM&P), mientras que el 37.8% correspondieron al resto del país. “VSRh”, Virus Sincitial Respiratorio humano; “S/D”, sin datos disponibles; “m”, meses; “a”, años; “AM&P”, Área Metropolitana y Periferia.

1.4 Secuenciación del Genoma Completo (WGS)

La WGS se realizó según lo descrito previamente (Goya, Lucion, et al., 2023). En resumen, se generó cDNA utilizando el sistema SuperScript IV First-Strand Synthesis (SSIV, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) con cuatro cebadores forward específicos para VSRh. Posteriormente, se realizaron cuatro reacciones de PCR independientes utilizando el kit Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), para generar cuatro amplicones superpuestos de aproximadamente 4 kb que abarcan el genoma completo del VSRh. Los amplicones se verificaron en gel de agarosa al 1 %, se agruparon y se emplearon para preparar bibliotecas mediante el kit Nextera XT (Illumina, USA, cat. FC-131-1096). Las bibliotecas se secuenciaron en un Illumina MiSeq con corrida paired-end 2 × 250.

1.5 Análisis de secuenciación de nueva generación

Los datos crudos en formato FASTQ pareados (Illumina; R1/R2) se procesaron mediante la pipeline `gencomvariable v2.0` (<https://github.com/AAMCgenomics/gencomvariable.git>), ejecutada en un entorno Linux. Para cada muestra, las lecturas se sometieron a control de calidad y filtrado utilizando `fastp` (S. Chen et al., 2018), conservando lecturas con puntaje de calidad promedio $\geq Q30$ y una longitud mínima de 200 pb. El filtrado generó archivos FASTQ depurados comprimidos (.fastq.gz) y reportes de calidad por muestra en formato HTML y JSON, permitiendo documentar métricas de calidad, longitud y distribución de bases. Posteriormente, los FASTQ filtrados se mapearon contra una secuencia de referencia de VSRh-A (GenBank ON237358.1) o VSRh-B (GenBank ON237214.1), según correspondiera. La referencia se descargó automáticamente desde GenBank y se utilizó para el alineamiento de lecturas pareadas mediante `minimap2` (H. Li, 2018), generando un archivo

SAM por muestra. Los alineamientos obtenidos se convirtieron y ordenaron en formato BAM, y a partir de este archivo se realizó el llamado de variantes en modo haploide para cada muestra. Las variantes identificadas se aplicaron sobre la secuencia de referencia para reconstruir el genoma consenso final en formato FASTA. Posteriormente, se evaluaron métricas de profundidad y cobertura de secuenciación para verificar la calidad y uniformidad del ensamblaje.

1.6 Análisis filogenético

Los genomas completos de referencia para VSRh-A y VSRh-B se descargaron del *RSV Genotyping Consensus Consortium* (<https://github.com/rsv-lineages>) con fecha de acceso 26 de agosto de 2024. Las secuencias se compilaron según subgrupo y se alinearon con MAFFT v7.490 (Kato & Standley, 2013) y se visualizaron con Aliview v1.28 (Larsson, 2014). El mejor modelo de sustitución nucleotídica se determinó con ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), y los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud se inferieron usando IQ-TREE v2.2.0 (Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015). El soporte de ramas se evaluó mediante 1,000 réplicas de bootstrap ultrarrápido (Nguyen et al., 2015). Los árboles fueron visualizados con FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

1.7 Aislamiento Viral

Un total de 311 muestras clínicas seleccionadas para secuenciación del genoma completo de VSRh (Ct <28), correspondientes a 111 del periodo 2006-2017 y 200 del periodo 2018-2024, fueron alicuotadas y diluidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS) inactivado, y utilizadas para infectar monocapas de células HEp-2 en placas de 12 pocillos, según lo descrito previamente (García

et al., 1994). En ausencia de efecto citopático, los cultivos fueron sometidos hasta a cinco pasajes seriados. Cuando se observó efecto citopático, las células se desprendieron en el medio y la suspensión se almacenó en nitrógeno líquido. La presencia de efecto citopático fue confirmada como infección por VSRh mediante RT-qPCR.

1.8 Titulación Viral

Para la determinación de la titulación viral, los aislados de VSRh se cuantificaron en unidades formadoras de focos o Focus-Forming Units (FFU) mediante infección de células HEp-2 a alta confluencia en placas de 96 pocillos (aproximadamente 5×10^4 células por pocillo). Las células fueron inoculadas con 150 μ L del virus aislado a una dilución inicial 1:10, seguida de diluciones seriadas en base 3, utilizando como diluyente DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina y 2% de suero fetal bovino. Tras 48 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂, se retiró el sobrenadante y las células se fijaron con metanol frío y peróxido de hidrógeno al 2%. La detección del antígeno viral se realizó mediante inmunohistoquímica empleando un cóctel de anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra las proteínas G (021/1G y 021/21G) (Martínez et al., 1997) y F (47F, 101F, 56F y 2F) (Garcia-Barreno et al., 1989; Wu et al., 2007). Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (HRP), diluida 1:500 en 1% de BSA. Para la visualización de los focos infectivos, se añadieron 750 μ L de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) como sustrato cromogénico, preparado a partir de 20 mg de AEC (Sigma-Aldrich) disueltos en 6 mL de DMSO al 100% y mezclados con 12 mL de tampón citrato-fosfato 0.05 M y 25 μ L de H₂O₂ al 30%. La reacción se incubó durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, protegida de la luz directa. Finalmente, los focos teñidos se contaron mediante un microscopio invertido, permitiendo estimar la concentración viral de cada aislado en FFU.

1.9 Ensayo de Neutralización por Reducción de Focos (FRNT)

Los ensayos de neutralización se realizaron para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de seis anticuerpos altamente potentes: MEDI8897* (Nirsevimab parental) (Zhu et al., 2017), AM22, D25 y 5C4 (McLellan, Chen, Leung, et al., 2013), todos dirigidos al sitio antigénico Ø. Motavizumab, un derivado de Palivizumab con mayor potencia neutralizante dirigido al sitio II (Cingoz, 2009) y AM14 (Gilman et al., 2015), que se une predominantemente al sitio IV, similar a Clesrovimab. Como control de anticuerpos, se incluyó el anticuerpo anti-F de metapneumovirus MF14 (Battles et al., 2017). Los anticuerpos fueron evaluados contra cepas virales panameñas que fueron aisladas y previamente caracterizadas mediante secuenciación de genoma completo. Adicionalmente, se incluyeron como controles virales la cepa de referencia A2 (hRSV/A/A2, NC_038235.1) y la cepa MAD/GM3_5/13 (hRSV/B/GM3.5/MAD, MF443150.1).

El ensayo se realizó por duplicado, incubando diluciones seriadas de los mAbs en un rango de concentraciones comprendido entre 1.67 µg/mL y 0.0067 ng/mL, preparadas en DMEM suplementado con 2% de FCS inactivado junto con 100 FFU de los aislados de VSRh a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, 150 µL de estas mezclas se utilizaron para infectar 5×10⁴ células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Tras 48 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂, las células se fijaron y los focos de infección se detectaron mediante tinción inmunohistoquímica siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección de titulación viral.

Finalmente, los focos se cuantificaron mediante microscopía invertida y los valores de IC₅₀ se calcularon ajustando los datos experimentales a un modelo sigmoideal de cuatro parámetros (4PL) utilizando Microsoft Excel (Sebaugh, 2011).

1.10 Ensayo de Western-Blotting (WB)

Se emplearon ensayos de WB utilizando aislados de diferentes años epidémicos, a fin de analizar la eficiencia en el procesamiento de la F y posibles cambios en los patrones de glicosilación. Células infectadas con las diferentes cepas virales fueron tratadas con detergente CHAPS 1% (3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato) a fin de solubilizar las proteínas de membrana, sin ser desnaturalizadas. Las proteínas totales en la muestra se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en tampón Tris-glicina. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y sometidas a un agente bloqueante como RPN2125 2% (Merck, Alemania) en solución salina tamponada con Tween20 0.05%. A continuación, se realizó una incubación con anti-F VSRh Mab Palivizumab, D25 ó anti-p27 (Rezende et al., 2023) y un conjugado con peroxidasa (HRP) (1:1000). Por último, la reacción se reveló utilizando un sustrato quimioluminiscente recién preparado Cytiva RPN2232 (Merck, Alemania) y se expuso al equipo documentador.

2. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados derivados del análisis de la dinámica evolutiva y la caracterización genómica del VSRh en Panamá durante el periodo 2006–2024. Con el objetivo de integrar la evidencia generada a lo largo de casi dos décadas y facilitar su interpretación, los resultados se estructuran en tres secciones complementarias. En primer lugar, se presenta el análisis correspondiente al periodo 2006–2017, que establece la línea base de circulación viral, su clasificación filogenómica bajo el enfoque basado en genomas completos y la caracterización de la proteína F en una cepa preduplicación. Posteriormente, se abordan los resultados del periodo 2018–2024, donde se examinan con mayor detalle la

diversidad genómica reciente, los cambios en los patrones de circulación, incluyendo alteraciones asociadas a la pandemia de COVID-19, y la conservación antigénica del virus frente a anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína F, generando evidencia relevante para el país en un contexto previo a la implementación de intervenciones como la vacunación, cuyos hallazgos fueron además reportados en un artículo científico. Finalmente, se presenta un análisis integrador que sintetiza los principales patrones de circulación, diversidad genómica y dinámica evolutiva del VSRh a lo largo de todo el periodo de estudio.

2.1 Dinámica evolutiva, clasificación filogenómica y caracterización de la proteína

F en VSRh en Panamá: periodo 2006–2017

Entre enero de 2008 y diciembre de 2017, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Panamá detectó 5,342 casos positivos de VSRh, lo que representó el 32.9% de todos los virus respiratorios identificados en ese periodo (Figura 14). La serie se presenta a partir de 2008 debido a la ausencia de datos epidemiológicos consolidados para 2006-2007. Los datos muestran que el VSRh circula a niveles relativamente bajos durante todo el año, pero presenta un pico estacional marcado entre julio y diciembre, durante el cual la positividad semanal aumenta de forma abrupta y en algunas temporadas supera el 60% de las muestras analizadas (Figura 14). El periodo también muestra el efecto del cambio en el método diagnóstico. Hasta mediados de 2010, la detección se realizaba mediante inmunofluorescencia directa (DFA) con un panel comercial para virus respiratorios (Millipore, REF 3137, Burlington, MA, Estados Unidos), y a partir de agosto de ese mismo año se incorporó la RT-PCR en tiempo real (Kodani et al., 2011), lo que incrementó la sensibilidad del sistema y permitió una identificación más precisa de los brotes. La distribución por sexo y condición clínica evidencia un ligero predominio masculino (51.4%) y una mayor proporción de pacientes

hospitalizados (77.5%) (Tabla IV). La carga de enfermedad se concentró en la primera infancia, con 54.1% de los casos en lactantes menores de 6 meses, 16.2% en niños de 6–11 meses y 17.1% en el grupo de 1–4 años. Asimismo, el 60.4% de las muestras procedió del Área Metropolitana y su Periferia (distritos de Panamá, San Miguelito, Arraiján y La Chorrera), zonas de alta densidad poblacional (Tabla IV).

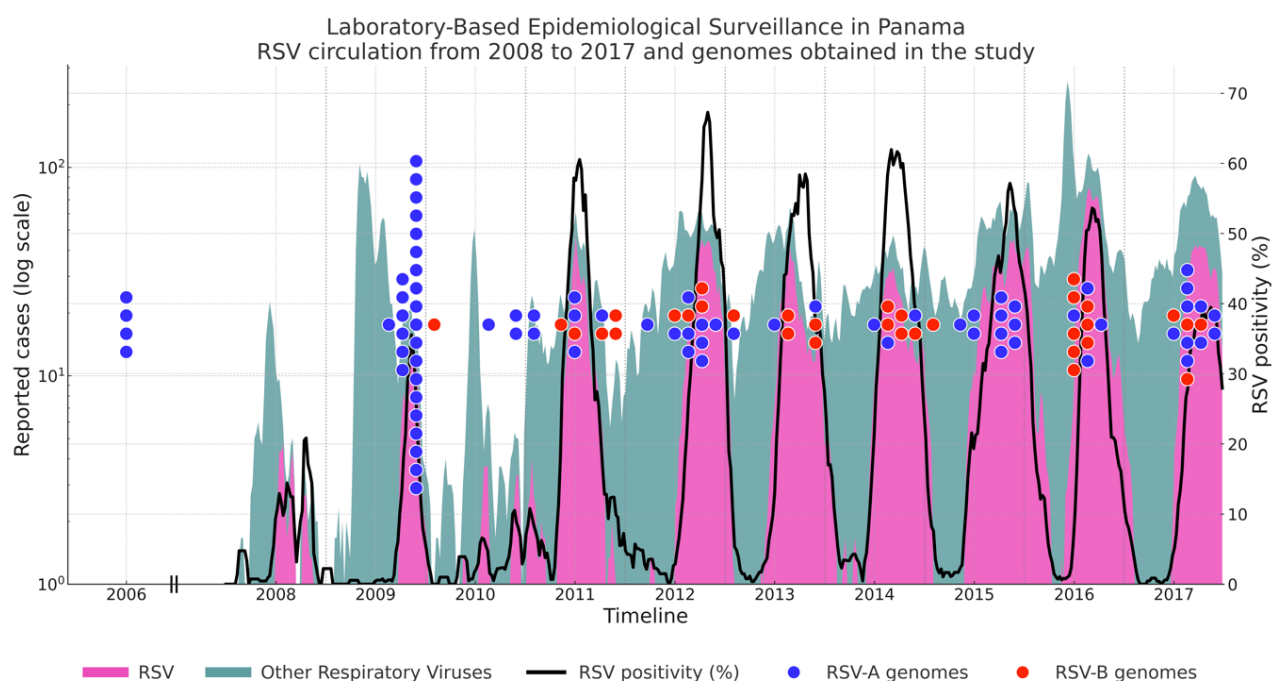


Figura 14. Tendencias anuales de casos reportados de VSRh (área magenta) y de otros virus respiratorios (área verde) en vigilancia epidemiológica por laboratorio en Panamá, mostradas en escala logarítmica. La línea negra indica el porcentaje de positividad para VSRh. Los puntos representan los genomas generados en este estudio, distinguidos por subgrupo: VSRh-A (azul) y VSRh-B (rojo), distribuidos según el mes/brote epidémico en el que fueron detectados.

Tabla IV. Genomas de VSRh obtenidos, distribuidos por período de circulación, grupo antigénico y características demográficas de los pacientes en Panamá.

Epidemiología de los pacientes en Panamá.																							
Características	Brote Estacional										Total												
	2006		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		Group		Total (%)
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Genomas obtenidos	4		26		3	1	6	5	9	4	3	5	3	5	10	1	4	8	10	4	78	33	111 (100)
Género																							
Masculino			11		3	1	5	2	6	3	2	2	2	1	3		4	7	5		41	16	57 (51.4)
Femenino			15				1	3	3	1	1	3	1	4	7	1		1	5	4	33	17	50 (45.0)
S/D	4																				4	0	4 (3.6)
Estado Clínico																							
Hospitalizado			18		3	1	6	1	8	3	2	5	3	4	9	1	3	7	9	3	61	25	86 (77.5)
Ambulatorio			5				3	1	1		1		1	1			1	1	1	1	10	7	17 (15.3)
S/D	4		3				1														7	1	8 (7.2)
Edad del paciente																							
< 6m			17		2	1	4		5	2	2	2	2	2	6	1	3	4	5	2	46	14	60 (54.1)
6 - 11m			3				1	2				2	1	1	2		3	3			10	8	18 (16.2)
1 - 4a			1		1		1	1	1	1		1		1	2		1	1	2	1	9	6	19 (17.1)
5 - 49a			5				1	3	1												8	2	6 (5.4)
≥50a										1			1						1		1	2	3 (2.7)
S/D	4						1	1													4	1	5 (4.5)
Área Geográfica																							
AM&P			15		2		4	4	5	3	2	5	2	1	9		2	5	6	2	47	20	67 (60.4)
Resto del País			10		1	1	2	1	4	1	1		1	4	1	1	2	3	4	2	26	13	39 (35.1)
N/A	4		1																		5	0	5 (4.5)

Entre 2006 y 2017 se obtuvieron 111 genomas completos de VSRh, de los cuales 78 (70.3%) correspondieron al subgrupo A y 33 (29.7%) al subgrupo B. La mayoría de las muestras procedieron de pacientes masculinos (51.4%), hospitalizados (77.5%), y de lactantes menores de 6 meses (54.1%). En cuanto a la distribución geográfica, 60.4% de los genomas provinieron de pacientes del Área Metropolitana y Periferia, mientras que 35.1% correspondieron al resto del país. "VSRh", Virus Sincitial Respiratorio humano; "A", VSRh subgrupo A; "B", VSRh subgrupo B; "S/D", sin datos disponibles; "m", meses; "a", años; "AM&P", Área Metropolitana y Periferia.

Entre 2006 y 2017 se observaron variaciones interanuales en el predominio de los subgrupos del VSRh en Panamá, con temporadas en las que el subgrupo A fue claramente dominante y otras con una participación más equilibrada entre A y B (Tabla IV). A lo largo del periodo se identificaron múltiples linajes dentro de ambos subgrupos (Tabla V). En el subgrupo A se detectaron seis linajes distintos (A.2.1.1, A.3.1, A.3.1.1, A.D, A.D.1 y A.D.2.2) (Figura 15), con evidencia de co-circulación de hasta dos o tres linajes en varios brotes, particularmente

durante 2011, 2015 y 2017 (Tabla V). El linaje A.3.1 predominó de manera marcada en 2009, pero fue posteriormente desplazado por el linaje A.D, que mostró la distribución más amplia y persistente, manteniéndose activo en la mayoría de los años entre 2011 y 2017.

Para el subgrupo B también se identificaron seis linajes (B.D, B.D.1, B.D.1.1, B.D.4, B.D.4.1 y B.D.4.1.1) (Figura 15), aunque su presencia anual fue más limitada y, por lo general, con circulación simultánea de uno o dos linajes por temporada, incluyendo patrones de aparición esporádica como B.D.4, detectado únicamente en 2015, y B.D.4.1.1, cuyo registro más temprano corresponde a la temporada de 2017, indicando el inicio de su circulación en el país (Tabla V). Estos hallazgos evidencian una marcada diversidad genómica del VSRh en Panamá durante el periodo analizado, con alternancia en el predominio de linajes y frecuentes episodios de co-circulación dentro de cada brote estacional, sin encontrarse asociación significativa entre el subgrupo viral y el sexo, el estado clínico, la edad ni la zona geográfica de procedencia de los pacientes (prueba exacta de Fisher, $p > 0.1$). (Tabla VI)

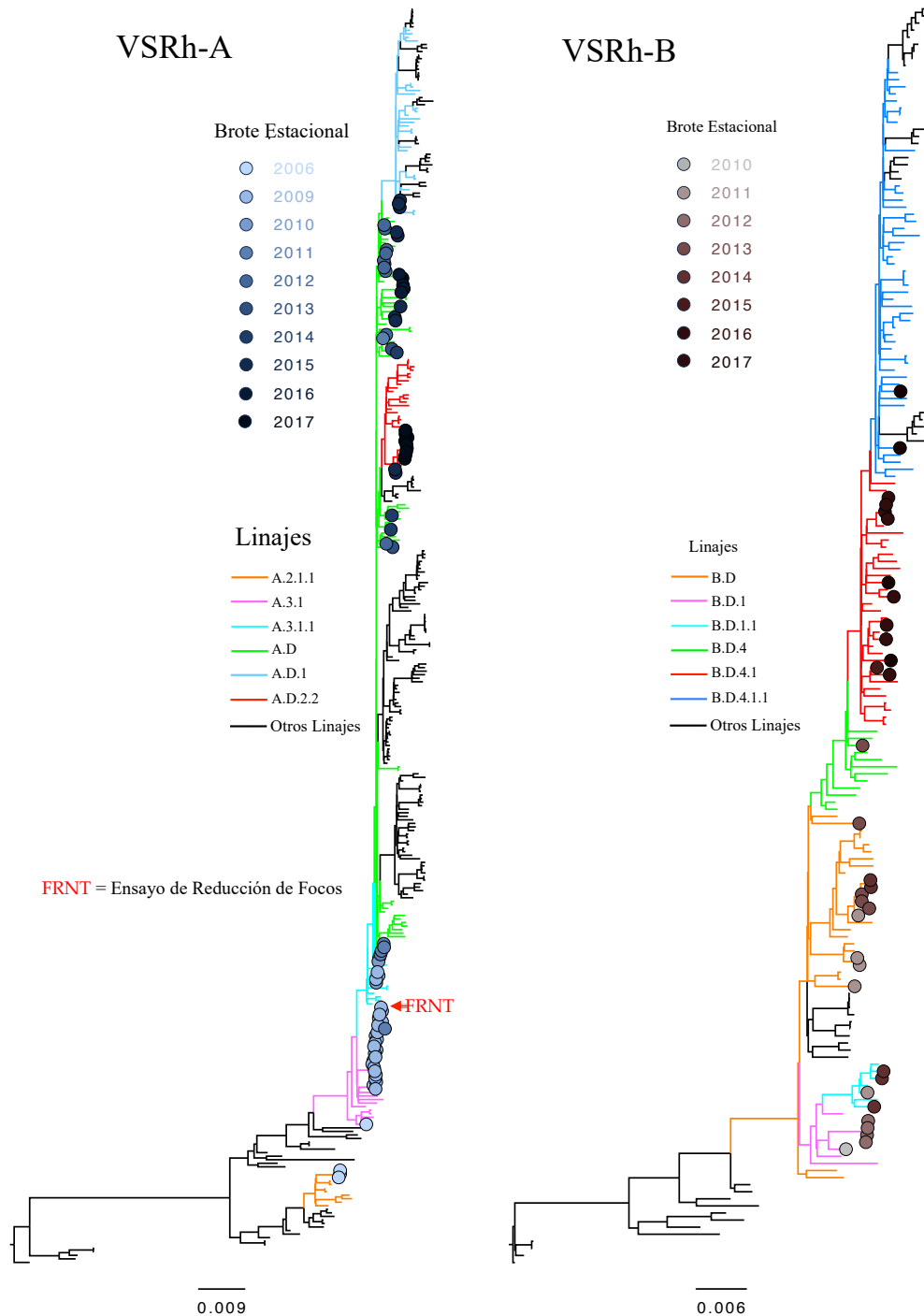


Figura 15. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de los genomas completos de VSRh-A (izquierda) y VSRh-B (derecha), agrupados con cepas de referencia. Los genomas de Panamá se representan con círculos coloreados según el brote estacional, desde celeste claro (2006) hasta azul oscuro (2017) en VSRh-A, y desde gris claro (2010) hasta rojo oscuro (2017) en VSRh-B. Los linajes dentro de cada subgrupo se indican por los colores de las ramas del árbol. La cepa marcada con “FRNT” corresponden a la utilizada en el ensayo de neutralización por reducción de focos (Focus Reduction Neutralization Test). La barra de escala indica sustituciones nucleotídicas por sitio.

Tabla V: Distribución de los genomas completos de VSRh por linaje y brote estacional (2006–2017)

Características	Brotos Estacionales										Total (%)
	2006	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Genomas obtenidos	4	26	4	11	13	8	8	11	12	14	111 (100)
Subgrupo A											
Linajes											
A.2.1.1	3										3 (2.7)
A.3.1	1	23		1							25 (22.5)
A.3.1.1		3	3								6 (5.4)
A.D				5	9	3	3	5	4	1	30 (27.0)
A.D.1								3			3 (2.7)
A.D.2.2								2		9	11 (9.9)
Subgrupo B											
Linajes											
B.D				4		4	2				10 (9.0)
B.D.1			1		4						5 (4.5)
B.D.1.1				1			3				4 (3.6)
B.D.4						1					1 (0.9)
B.D.4.1								1	8	2	11 (9.9)
B.D.4.1.1										2	2 (1.8)

Distribución de los genomas completos de VSRh obtenidos entre 2006 y 2017, clasificados por subgrupo A (linajes A.2.1.1, A.3.1, A.3.1.1, A.D, A.D.1 y A.D.2.2) y subgrupo B (linajes B.D, B.D.1, B.D.1.1, B.D.4, B.D.4.1 y B.D.4.1.1), según el período de circulación asociado a cada brote estacional. La tabla presenta el número de genomas identificados por año y el porcentaje que representa cada linaje dentro del total analizado. "VSRh", Virus Sincitial Respiratorio humano.

Tabla VI. Distribución de linajes de VSRh y características clínicas y demográficas de los pacientes (2006–2017)

Características	VSRh-A Linajes						Total VSRh-A	VSRh-B Linajes						Total VSRh-B	Total
	A.2.1.1	A.3.1	A.3.1.1	A.D	A.D.1	A.D.2.2		B.D	B.D.1	B.D.1.1	B.D.4	B.D.4.1	B.D.4.1.1		
Genomas obtenidos	3	25	6	30	3	11	78	10	5	4	1	11	2	33	111
Género															
Masculino		10	4	20	2	5	41	4	4	1		7		16	57
Femenino		14	2	10	1	6	33	6	1	3	1	4	2	17	50
S/D	3	1					4								4
Estado Clínico															
Hospitalizado		18	4	26	3	10	61	7	4	2	1	9	2	25	86
Ambulatorio		3	2	4		1	10	3	1	1		2		7	17
S/D	3	4					7			1				1	8
Edad del paciente															
< 6m		16	4	17	3	6	46	2	3	1	1	5	2	14	60
6 - 11m		2	1	3		4	10	4		1		3		8	18
1 - 4a		5	1	6		1	13	3	1			2		6	19
5 - 49a		1		3			4	1	1					2	6
≥50a				1			1			1		1		2	3
S/D	3	1					4			1				1	5
Área Geográfica															
AM&P		15	3	20	2	7	47	8	3	1	1	7		20	67
Resto del País		8	3	10	1	4	26	2	2	3		4	2	13	39
N/A	3	2					5								5

Se presentan los genomas obtenidos de cada linaje VSRh-A y VSRh-B, desagregados por género, estado clínico, grupo etario y área geográfica de procedencia. Los valores corresponden al número de casos registrados por cada brote estacional.. "VSRh", Virus Sincitial Respiratorio humano; "A", VSRh subgrupo A; "B", VSRh subgrupo B; "m", meses; "a", años; "AM&P", Área metropolitana y periferia

Para evaluar la sensibilidad de las cepas de VSRh detectadas en Panamá frente a diferentes anticuerpos monoclonales, se aislaron exitosamente 7 de 111 cepas, las cuales presentaron el efecto citopático característico (Figura 16), todos pertenecientes al subgrupo VSRh-A y clasificados dentro del linaje A.3.1. De forma notable, todas las cepas recuperadas correspondieron a muestras obtenidas durante el brote de 2009. Aunque la caracterización molecular identificó otros linajes en años posteriores, estos no contaban con aislados recuperables, lo que limitó la representatividad genética en los ensayos de neutralización.

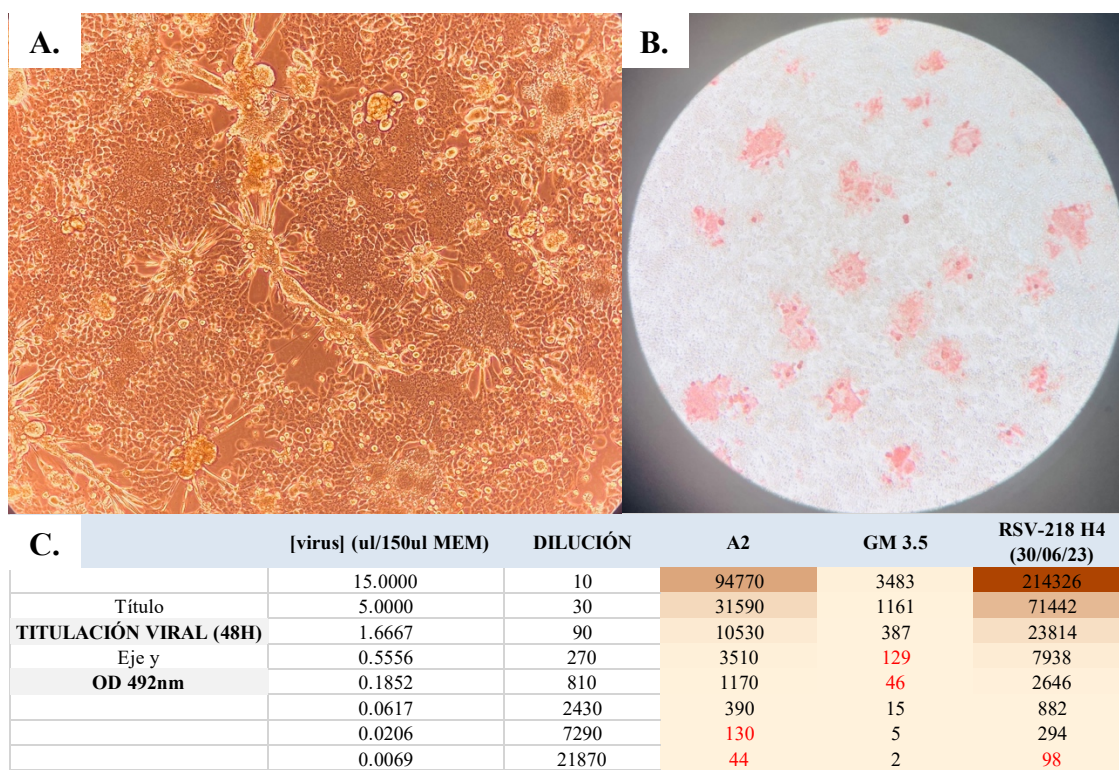


Figura 16. Ensayos de aislamiento, visualización y titulación viral de VSRh. (A) Efecto citopático (CPE) característico inducido por la cepa *hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009* tras 48 horas de infección en células HEp-2, mostrando áreas de redondeo, desprendimiento celular y formación de conglomerados. (B) Unidades formadoras de focos (FFU) generadas por la misma cepa, visualizadas mediante microscopio invertido tras tinción inmunohistoquímica con sustrato AEC, permitiendo la detección del antígeno viral. (C) Ensayo de titulación viral mediante conteo de FFU, realizado para determinar los títulos infecciosos tanto de la cepa panameña como de los controles de referencia empleados en los ensayos de neutralización. Este procedimiento es fundamental para estandarizar la cantidad de virus utilizada en el ensayo, establecida en 100 FFU por pozo, y calcular con precisión la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los anticuerpos evaluados.

Los valores de Ct obtenidos por RT-qPCR de los hisopados nasofaríngeos de los cuales se obtuvieron los aislados oscilaron entre 16.5 y 21.2, con una mediana de 19.6 (Tabla VII). Dado que todas las cepas presentaban secuencias con elevado porcentaje de identidad en el gen F (seis de ellas completamente idénticas), se seleccionó la cepa *hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009* (A.3.1) como representativa para los ensayos de neutralización, principalmente por su elevado título viral (5.9×10^6 FFU/mL) (Figura 16). Esta cepa mostró una marcada sensibilidad frente a los anticuerpos monoclonales evaluados, particularmente frente a MEDI8897*, con un valor de IC₅₀ de 3.05 ng/mL; mientras que para los demás anticuerpos los valores fueron ligeramente superiores, pero dentro del rango de actividad subnanomolar (Figura 17) (Tabla VIII).

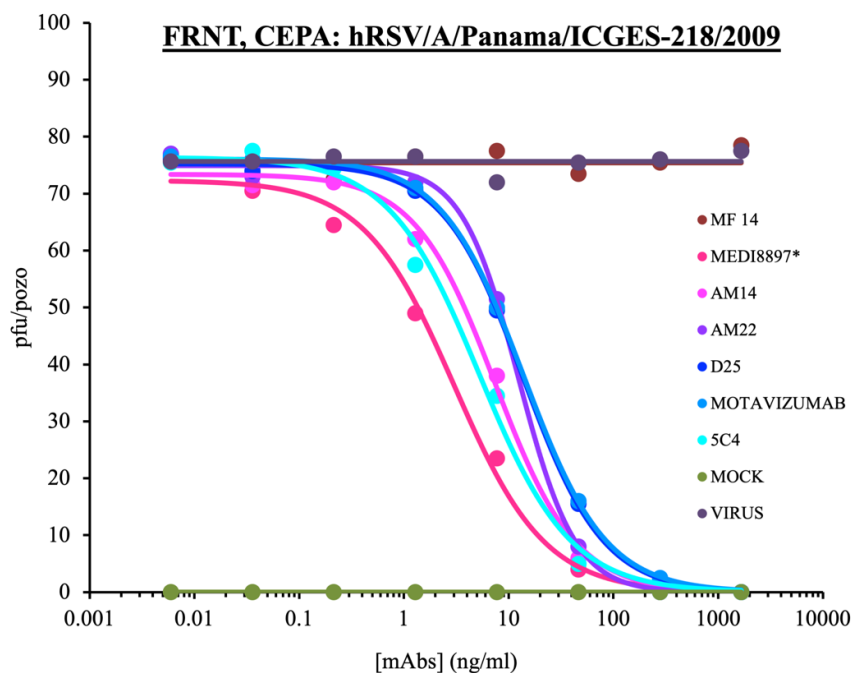


Figura 17. Curvas de neutralización obtenidas mediante el ensayo FRNT para la cepa panameña *hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009*. Se evaluó la actividad inhibidora de seis anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína F (MEDI8897*, AM14, AM22, D25, Motavizumab y 5C4), junto con el anticuerpo irrelevante MF14 (control negativo), un control viral sin anticuerpos (VIRUS) y un control celular (MOCK). Los valores de IC₅₀ se calcularon ajustando los datos experimentales a un modelo sigmoide de cuatro parámetros (4PL). Las curvas muestran la reducción dependiente de la concentración en el número de FFU, reflejando la potencia neutralizante relativa de cada anticuerpo frente al aislado evaluado.

Tabla VII. Información sobre las cepas de VSRh aisladas y la seleccionada para el ensayo de neutralización con anticuerpos monoclonales.

Subgrupo	Nombre de la cepa	Valor Ct (muestra original)	Linaje	Mutaciones en proteína F (comparadas contra referencias NCBI)				Mutaciones en F (comparado contra referencia GISAID)	FRNT
				Sitio de Unión			Otras Mutaciones		
				Sitio Ø: MEDI8897*, AM22, D25 y 5C4	Sitio II: Motavizumab	Sitio IV/V: AM14 (Clersovimab)			
VSRh-A									
1-	<i>hRSV/A/Panama/ICG ES-218/2009</i>	21.2	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A		sí
2-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-223/2009</i>	19.6	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, T58A, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A	T58A	no
3-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-226/2009</i>	19.5	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A		no
4-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-227/2009</i>	20.8	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A		no
5-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-228/2009</i>	16.5	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A		no

6-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-229/2009</i>	20.1	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A	no
7-	<i>hRSV/A/Panama/ICGE S-231/2009</i>	19.2	A.3.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V, S540A	no

“VSRh”, Virus Sincitial Respiratorio humano; “VSRh-A”, VSRh subgrupo A; “FRNT”, prueba de neutralización.
Para el análisis de mutaciones en la proteína F se utilizaron la secuencia de referencia del NCBI GenBank (NC_038235) y la de EpiRSV GISAID (EPI_ISL_412866).
Sitio antigénico Ø en la proteína F del VSRh: residuos 62–69 en la subunidad F2 y 196–212 en la subunidad F1 (McLellan, Chen, Leung, et al., 2013; Zhu et al., 2017) .
Sitio antigénico II en la proteína F del VSRh: residuos 255–277 en la subunidad F1 (Mas et al., 2018).
Sitio antigénico IV en la proteína F del VSRh: residuos E161, S182 y 426–447 en la subunidad F1 (Gilman et al., 2015; Tang et al., 2019)

Tabla VIII. Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales frente a VSRh

Nombre de la cepa	Anticuerpos monoclonales (mAbs)						
	MEDI8897*	AM14	AM22	D25	MOTAVIZUMAB	5C4	MF14
<i>hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009</i> (A.3.1)	3.05	7.44	12.50	13.82	13.88	5.28	> 1666
<i>hRSV/A/A2 Strain</i> (Control) (NC_038235.1)	1.22	7.00	3.00	24.13	25.84	5.12	> 1666
<i>hRSV/B/GM3.5/MAD</i> (Control) (MF443150.1)	3.15	4.52	9.77	22.78	35.87	> 1666	> 1666

“IC₅₀”, concentración inhibitoria media.

Se evaluó la susceptibilidad de un aislado panameño de VSRh (2009) frente a diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína F del virus. Los anticuerpos MEDI8897*, AM14, AM22, D25, Motavizumab y 5C4 mostraron valores promedio de IC₅₀ de 2.47, 6.32, 8.42, 20.24, 25.20 y 5.20 ng/mL, respectivamente. El anticuerpo irrelevante MF14 (anti-F de metapneumovirus humano) presentó un IC₅₀ >1666 ng/mL, confirmando ausencia de actividad neutralizante específica frente al VSRh.

Un análisis detallado de la secuencia de la proteína F en las cepas de VSRh-A aisladas reveló la presencia de varias sustituciones de aminoácidos en comparación con la cepa de referencia disponible en NCBI GenBank (número de acceso NC_038235). No se identificaron cambios en el sitio antigénico Ø, correspondiente al epítipo de unión de MEDI8897*, AM22, D25 y 5C4. En el sitio antigénico II, reconocido por Motavizumab, únicamente se detectó la sustitución N276S. En el sitio antigénico IV, que constituye el sitio de unión de Clesrovimab y es similar al de AM14, todas las cepas de VSRh-A presentaron consistentemente la sustitución M447V. Asimismo, se identificaron sustituciones adicionales distribuidas en otras regiones de la proteína F, incluyendo L4P, A8T, T16A, T58A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, N276S, I379V, V384I, M447V y S540A. La sustitución T58A se detectó exclusivamente en la cepa *hRSV/A/Panama/ICGES-223/2009*. La proteína F de seis de las cepas aisladas mostró 100% de homología con la secuencia de referencia de GISAID (*hRSV/A/England/397/2017*; EPI_ISL_412866), lo que evidencia la alta estabilidad de este gen dentro de la dinámica evolutiva del VSRh.

Al ampliar el análisis a los 78 genomas completos de VSRh-A obtenidos en esta parte del estudio, se identificó que las tres cepas pertenecientes al linaje A.2.1.1 presentaban la sustitución D200N, localizada en el sitio Ø de la proteína F. Esta sustitución no se detectó en los linajes que circulan posteriormente, los cuales recuperan nuevamente la aspartato en esa posición. En sentido contrario, la sustitución N276S, ubicada en el sitio antigénico II y detectada en las cepas aisladas, estuvo presente en todos los linajes identificados en el periodo, excepto en A.2.1.1, siendo un aminoácido definitorio de este linaje. Finalmente, la sustitución M447V, localizada en el sitio antigénico IV, no solo fue identificada de manera consistente en todas las cepas aisladas, sino que también se encontró en la totalidad de los

genomas completos de VSRh-A incluidos en este estudio, lo que subraya su estabilidad y amplia distribución durante el periodo evaluado. A pesar de no haberse obtenido aislados de VSRh-B, el análisis comparativo de las 33 secuencias genómicas generadas en este estudio, frente a la cepa de referencia NC_001781, permitió identificar varias sustituciones dentro del sitio antigénico Ø de la proteína F. En particular, se detectó la mutación Q209K en dos cepas pertenecientes al linaje B.D del brote de 2011, mientras que las cepas del linaje B.D.4.1.1 del brote de 2017 presentaron las sustituciones I206M/Q209R, todas ellas localizadas en este epítipo. En contraste, no se observaron cambios en los sitios antigénicos II ni IV durante el periodo analizado.

Con el objetivo de determinar si variaciones en la glicosilación podían afectar el procesamiento del péptido p27, se evaluó por Western blot la proteína F de la cepa *hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009*, que presenta la mutación A122T generando un motivo N-X-T, potencialmente asociado a la adquisición de un nuevo sitio de N-glicosilación dentro del péptido p27 (Figura 18). Se planteó que esta sustitución podría alterar la eficiencia del corte proteolítico entre F2 y F1; sin embargo, el patrón de bandas obtenido mostró las mismas formas F0, F1+p27 y F1 que las observadas en los virus control (antiguas y contemporáneas). La ausencia de diferencias en el procesamiento proteolítico indica que la mutación A122T no modifica la escisión del péptido p27, lo que sugiere que este cambio no impacta la maduración de la proteína F en esta cepa. (Figura 18)

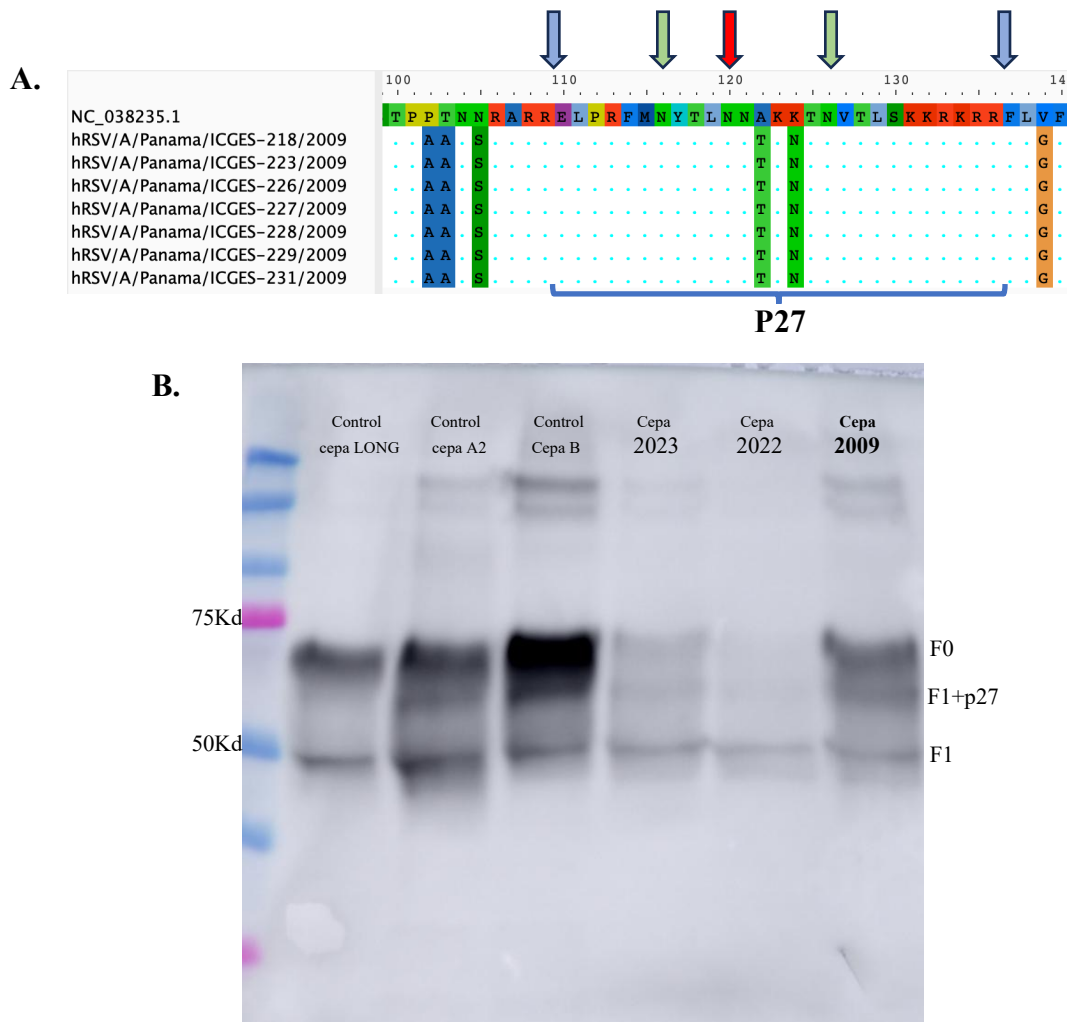


Figura 18. Variación en p27 y procesamiento de la proteína F en cepa aislada. **(A)** Alineamiento del segmento p27 de la proteína F del RSVh-A, comparando la secuencia de referencia (NC_038235.1) con los aislados panameños de 2009. Las flechas azules indican los dos sitios de corte por furina que delimitan el péptido p27. Las flechas verdes señalan los sitios potenciales de N-glicosilación (motivo N-X-S/T) presentes en la secuencia de referencia y conservados en los aislados. La flecha roja indica un nuevo motivo de N-glicosilación adquirido en las cepas panameñas (A122T, genera un motivo N-X-T). El marco inferior muestra el intervalo correspondiente al péptido p27. **(B)** Detección del procesamiento proteolítico de la proteína F del VSRh mediante Western blot. Análisis por Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la región 476–510 de la proteína F. Se evaluó la presencia de las formas no cortada (F0), parcialmente procesada (F1 + p27) y cortada (F1) en diferentes aislados clínicos de VSRh. Las bandas observadas alrededor de ~70 kDa, ~60 kDa y ~50 kDa corresponden a F0, F1+p27 y F1, respectivamente.

DISCUSIÓN (Periodo 2006–2017)

Este estudio ofrece una caracterización integral del VSRh en Panamá durante el período 2006–2017, enfocándose principalmente en la diversidad genómica a lo largo de más de una década de circulación viral. Nuestros hallazgos revelan fluctuaciones en el predominio de los subgrupos VSRh-A y VSRh-B, así como la aparición, reemplazo y co-circulación de múltiples linajes entre temporadas. Además, se incluyó un análisis fenotípico puntual utilizando un aislado viral de 2009, lo que permitió explorar aspectos funcionales de la proteína F en un contexto previo a las intervenciones preventivas modernas. Estos resultados contribuyen a una comprensión más profunda de la dinámica evolutiva y epidemiológica del VSRh en un país altamente conectado a nivel regional y global, un factor que probablemente influye en la introducción, dispersión y persistencia de variantes virales.

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica registró, entre 2006 y 2017, una cantidad importante de casos asociados al VSRh, con brotes epidémicos anuales claramente definidos durante todo el periodo. Estos incrementos se concentraron de forma consistente en los meses lluviosos, un comportamiento previamente documentado para países tropicales (Weber et al., 1998) y también observado puntualmente en Panamá durante 4 años (Ábrego et al., 2017). Además, al situar estos hallazgos dentro del contexto regional, se observa que la dinámica temporal del VSRh en Panamá coincide con lo reportado para Centroamérica, donde la actividad suele iniciar a mediados de año y extenderse durante varios meses, en línea con la tendencia regional en la que los picos epidémicos se desplazan gradualmente desde los países del sur hacia los del norte del continente (Couto et al., 2025).

La transición desde métodos antigénicos hacia técnicas moleculares fortaleció de forma notable la detección del VSRh durante el periodo estudiado. En particular, la incorporación de la RT-PCR en tiempo real fortaleció de manera notable la capacidad diagnóstica del sistema, al ofrecer una sensibilidad considerablemente mayor que la DFA y permitir la detección de casos con cargas virales bajas (Jha et al., 2016; Zhang et al., 2015). Este cambio metodológico explica, en parte, el aumento en la identificación de casos y la delimitación más clara de los brotes durante el periodo analizado.

Los patrones observados en nuestro estudio confirman que la mayor carga de enfermedad por VSRh se concentra en los primeros meses de vida, particularmente en lactantes menores de seis meses, quienes representaron más de la mitad de los casos detectados y constituyen el grupo con mayor riesgo de evolucionar a enfermedad respiratoria baja grave (Hall et al., 2009; Simoes, 2003). Esta vulnerabilidad temprana es coherente con lo reportado para la región, incluyendo cohortes centroamericanas donde los niños menores de tres meses presentan las tasas más elevadas de infección y hospitalización por VSRh (Azziz-Baumgartner, Duca, Gonzalez, et al., 2022). Además, el ligero predominio masculino y la alta proporción de hospitalizaciones en nuestra serie coinciden con hallazgos previos que señalan al sexo masculino como un factor asociado a mayor severidad clínica en etapas tempranas de la vida (Simoes, 2003). La concentración de casos en el Área Metropolitana y su Periferia también es consistente con lo descrito para poblaciones urbanas densamente pobladas, donde factores demográficos y de exposición pueden amplificar la transmisión en los meses de mayor circulación viral (Simoes, 2003).

Las variaciones interanuales observadas entre los subgrupos A y B durante 2006-2017 son coherentes con patrones previamente descritos, donde los virus alternan su predominio entre temporadas y rara vez un mismo subgrupo o genotipo se mantiene dominante por periodos prolongados (Peret et al., 1998; Yu et al., 2019). Este comportamiento, documentado en distintos contextos, refleja la capacidad del VSRh para reemplazar cepas circulantes de manera frecuente, incluso dentro de un mismo subgrupo, lo que coincide con la alternancia marcada registrada en Panamá a lo largo del periodo analizado.

Aunque la clasificación de linajes del VSRh propuesta recientemente por el *RSV Genotyping Consensus Consortium* ha comenzado a adoptarse en estudios internacionales, la mayoría de estas investigaciones se basan en genomas completos generados a partir de 2015. Sin embargo, algunos trabajos que incluyen secuencias previas a la pandemia reportan ya la circulación de linajes hoy reconocidos, como A.D.1 y A.D.2.2 en diferentes países entre 2015 y 2017 (Rice et al., 2025; Tramuto et al., 2024). A nivel genético, los patrones observados en Panamá entre 2006 y 2017 son coherentes con la dinámica evolutiva descrita en otros países durante periodos cercanos. Para contextulizar esta discusión, los linajes A.3.1 y A.3.1.1 se asocian con el genotipo NA1 (antigua clasificación), mientras que los linajes A.D (incluyendo A.D.1 y A.D.2.2) corresponden al genotipo ON1 (antigua clasificación), ambos ampliamente reportados como predominantes en distintos escenarios entre 2009 y 2017. Estudios de Italia identificaron NA1 y ON1 como los genotipos circulantes a lo largo de cinco temporadas consecutivas (2009–2014) (Esposito et al., 2015), mientras que en Alemania ON1 se estableció como el genotipo dominante desde su introducción en 2011, acompañado de una circulación sostenida de NA1 hasta 2017 (Streng et al., 2019). De forma similar, investigaciones en Madagascar (2011–2017) documentaron la co-circulación de

NA1 y ON1 tras el reemplazo progresivo de variantes previas (Rahombanjanahary et al., 2020), y estudios en China y Arabia Saudita reportaron patrones comparables, con predominio de ON1 y presencia regular de NA1 en 2014 y 2017, respectivamente (A. Al-Sharif et al., 2020; Fan et al., 2017). En Sudamérica, datos de Argentina muestran un patrón comparable en donde el genotipo ON1 se introdujo en 2012 y, en pocas temporadas, desplazó por completo a las variantes previamente circulantes, convirtiéndose en el único linaje detectado para 2014 (Viegas et al., 2016).

En cuanto al VSRh-B, los linajes detectados por este estudio en Panamá se asocian al genotipo BA9 (antigua clasificación), coincidiendo con reportes que muestran su amplia distribución global antes de 2018, incluido su predominio en Bulgaria (2016–2018) y en el estudio multinacional INFORM-RSV, donde BA9 se identificó como el genotipo dominante a nivel mundial (Korsun et al., 2021; Tabor et al., 2020). La composición de linajes observada en Panamá reproduce de manera consistente los patrones evolutivos descritos en múltiples regiones, caracterizados por el establecimiento temprano de variantes asociadas al genotipo NA1, la posterior expansión del genotipo ON1 y la predominancia sostenida del linaje BA9 dentro del subgrupo B. La incorporación de genomas completos y la aplicación de la nueva clasificación de linajes en este estudio aporta un marco más preciso y actualizado para reinterpretar estas tendencias históricas, permitiendo ubicar la diversidad viral local en un contexto comparativo más robusto frente a las tendencias regionales y globales.

La ausencia de diferencias significativas entre los subgrupos en relación con sexo, edad o condición clínica en nuestra cohorte es coherente con estudios globales recientes, los cuales no han encontrado variaciones sustanciales en la gravedad clínica atribuibles al subgrupo

viral, pese a la coexistencia de múltiples linajes/genotipos dentro de cada grupo (Tabor et al., 2020). Sin embargo, la evidencia disponible continúa siendo limitada respecto a posibles variaciones de severidad asociadas a linajes específicos dentro de cada subgrupo, por lo que se requieren estudios clínicos mejor integrados con datos genómicos que permitan evaluar de manera más precisa eventuales asociaciones entre diversidad viral y desenlaces clínicos.

Por otro lado, el ensayo de neutralización mostró que la cepa *hRSV/A/Panama/ICGES-218/2009* (linaje A.3.1) presentó una alta sensibilidad frente a los anticuerpos monoclonales evaluados, con valores de IC₅₀ comparables a los descritos en estudios previos, lo que refuerza la elevada potencia neutralizante de estos MAbs (Gilman et al., 2015; McLellan, Chen, Leung, et al., 2013; Qing et al., 2017; Tang et al., 2019). A pesar de que esta cepa presentaba múltiples sustituciones en la proteína F con respecto a la referencia histórica, los sitios antigénicos reconocidos por los MAbs se mantuvieron conservados. Esta estabilidad es consistente con estudios que muestran que la proteína F conserva una baja diversidad y mantiene sus principales sitios antigénicos (Ø y II) a lo largo del tiempo (1956–2021), lo que sustenta la eficacia sostenida de estos anticuerpos (Wilkins et al., 2023).

En este contexto, las tres cepas del linaje A.2.1.1 identificadas en el brote de 2006 presentaron la sustitución D200N en el sitio Ø de la proteína F. Este cambio ha sido descrito en estudios globales como una variante poco frecuente y detectada de manera esporádica en periodos más recientes, con prevalencias muy bajas (Lamichhane et al., 2025; Wilkins et al., 2023), y sin evidencia actual de un impacto claro en la neutralización por anticuerpos monoclonales. De manera concordante, análisis más recientes han señalado su presencia ocasional en muestras previas a la introducción de nirsevimab, pero sin asociación conocida a escape o

disminución de sensibilidad (Lamichhane et al., 2025). Con respecto a la mutación N276S, la cual se ubica dentro del sitio antigénico II de la proteína F, no mostró asociación con escape a anticuerpos monoclonales. Aunque esta sustitución fue descrita inicialmente en un caso de falla a palivizumab (Abou-El-Hassan et al., 2019), estudios posteriores demostraron que N276S ocurre de forma natural y no confiere resistencia en ensayos de neutralización (Oliveira et al., 2015). Esto coincide con nuestros resultados, donde la cepa portadora de N276S mostró alta sensibilidad frente a todos los anticuerpos evaluados, incluido motavizumab. La mutación M447V corresponde a una variación presente en la referencia histórica del VSRh-A (NC_038235) y no tiene implicaciones antigénicas conocidas. Además, el epítipo de clesrovimab se mantiene altamente conservado, con 99.8% de identidad en más de 15,000 secuencias de VSRh depositadas en GenBank (Fridman et al., 2025). En el caso de RSV-B, las sustituciones Q209K y I206M/Q209R presentes en el sitio antigénico Ø no confieren resistencia; por el contrario, aumentan la afinidad del anticuerpo monoclonal. Estudios recientes muestran que estos cambios refuerzan las interacciones electrostáticas entre el epítipo y nirsevimab, lo que se traduce en una potenciación de la capacidad neutralizante frente a este subgrupo viral (Ahani et al., 2023; Okabe et al., 2025)

Para la cepa aislada VSRh-A panameña también evaluamos si variaciones en la glicosilación podían modificar el procesamiento del péptido p27. La mutación A122T, ubicada dentro de esta región y potencialmente asociada a la ganancia de un sitio de N-glicosilación en N120, no alteró el patrón de escisión de la proteína F: las formas F0, F1+p27 y F1 fueron indistinguibles de las de los controles. Este resultado coincide con evidencia previa que indica que las glicosilaciones de p27 no afectan el corte por furina ni la maduración de F (Rezende et al., 2023).

2.3 Dinámica evolutiva, diversidad genómica y evaluación de la conservación antigénica del VSRh en Panamá durante el periodo 2018–2024.

Resultados publicados en: Genomic Insights Into Respiratory Syncytial Virus Circulation Patterns And Neutralization By Anti-F Monoclonal Antibodies In Panama (2018–2024)

Danilo Franco^{1,2} | Stephanie Goya³ | Alexander Martínez^{4,5,6} | Vicente Mas⁷ | Brechla Moreno¹ | Elimelec Valdespino¹ | Melissa Gaitán⁸ | Lisseth Sáenz⁸ | Claudia González^{4,6} | Ambar Moreno⁴ | Zeuz Capitan-Barrios^{9,10} | Jean Paul Carrera^{8,10,11} | Sandra López-Vergès^{5,8} | Juan Miguel Pascual^{4,5,6} | Yaira Moltó¹² | Lourdes Moreno¹² | Belmaris Rizo¹³ | Enrique Urriola¹³ | Teresa Delgado⁷ | María Iglesias-Caballero⁷ | Inmaculada Casas⁷ | Suman R. Das¹⁴ | Juan Arbiza¹⁵ | Adriana Delfraro^{2,15} | Leyda Ábrego^{5,8,9,10,11}

Este estudio describe la evolución genómica del VSRh en Panamá entre 2018 y 2024 mediante secuenciación completa del genoma y ensayos de neutralización. El proyecto generó 200 genomas de este periodo, de los cuales se seleccionaron 115 para el análisis. La selección fue aleatoria, con un máximo de 20 genomas por brote; en 2018 y 2021 se incluyeron los 18 y 8 genomas disponibles. En cada brote se conservó la proporción de subgrupos y linajes detectados. Se observó alternancia anual entre VSRh-A y VSRh-B, con cocirculación de múltiples linajes y variaciones asociadas a la pandemia. VSRh-A mostró mayor diversidad genética, mientras que VSRh-B incluyó linajes asociados a mayor hospitalización. Todas las cepas fueron altamente sensibles a anticuerpos monoclonales de relevancia terapéutica dirigidos a la proteína F, incluido el precursor de nirsevimab. Estos resultados establecen una línea basal esencial para evaluar el impacto de futuras intervenciones preventivas en Panamá.

1 Modular Specialized Laboratory, Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama | 2 Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de La República, Montevideo, Uruguay | 3 Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA | 4 Department of Genomic and Proteomic, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama City, Panama | 5 National Research System (SNI), National Secretary of Research, Technology and Innovation (SENACYT), Panama City, Panama | 6 Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina, Universidad de Panamá, Panama City, Panama | 7 Laboratory of Reference and Research in Respiratory Viruses, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain | 8 Virology Research Laboratory, Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama | 9 Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Panamá, Panama City, Panama | 10 Carson Centre for Research in Environment and Emerging Infectious Diseases, Darien, Panama | 11 Centro Regional de Innovación en Vacunas y Biofarmacos, CRIVB AIP, Panama City, Panama | 12 National Department of Epidemiology, Ministry of Health, Panama, Panama | 13 Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panama City, Panama | 14 Department of

Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, USA | 15 Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay

ORIGINAL ARTICLE OPEN ACCESS

Genomic Insights Into Respiratory Syncytial Virus Circulation Patterns and Neutralization by Anti-F Monoclonal Antibodies in Panama (2018–2024)

Danilo Franco^{1,2} | Stephanie Goya³ | Alexander Martínez^{4,5,6} | Vicente Mas⁷ | Brechla Moreno¹ | Elimelec Valdespino¹ | Melissa Gaitán⁸ | Lisseth Sáenz⁸ | Claudia González^{4,6} | Ambar Moreno⁴ | Zeuz Capitan-Barrios^{9,10} | Jean Paul Carrera^{8,10,11} | Sandra López-Vergès^{5,8} | Juan Miguel Pascale^{4,5,6} | Yadira Moltó¹² | Lourdes Moreno¹² | Belmaris Rizo¹³ | Enrique Urriola¹³ | Teresa Delgado⁷ | María Iglesias-Caballero⁷ | Inmaculada Casas⁷ | Suman R. Das¹⁴ | Juan Arbiza¹⁵ | Adriana Delfraro^{2,15} | Leyda Ábrego^{5,8,9,10,11}

¹Modular Specialized Laboratory, Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama | ²Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de La República, Montevideo, Uruguay | ³Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA | ⁴Department of Genomic and Proteomic, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama City, Panama | ⁵National Research System (SNI), National Secretary of Research, Technology and Innovation (SENACYT), Panama City, Panama | ⁶Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina, Universidad de Panamá, Panama City, Panama | ⁷Laboratory of Reference and Research in Respiratory Viruses, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain | ⁸Virology Research Laboratory, Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama | ⁹Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Panamá, Panama City, Panamá | ¹⁰Carson Centre for Research in Environment and Emerging Infectious Diseases, Darien, Panama | ¹¹Centro Regional de Innovación en Vacunas y Biofármacos, CRIVB AIP, Panama City, Panama | ¹²National Department of Epidemiology, Ministry of Health, Panama, Panama | ¹³Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panama City, Panama | ¹⁴Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, USA | ¹⁵Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay

Correspondence: Adriana Delfraro (adriana@fcien.edu.uy) | Leyda Ábrego (leyda.abrego@up.ac.pa)

Received: 4 June 2025 | **Revised:** 16 September 2025 | **Accepted:** 21 September 2025

Funding: This work was supported by Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, <https://doi.org/10.13039/501100007061>, grant no. FID22-106; Instituto de Salud Carlos III, <https://doi.org/10.13039/501100004587>, grant nos. PI21CIII/00019 and PI22CIII/00054; COVIDSEQ-UNESPA, MPY 226/22; and EU4Health Programme (EU4H), EU4H-2022-DGA-MS-IBA-01-02-101113109.

Keywords: lineages | Nirsevimab | respiratory syncytial virus

ABSTRACT

Background: Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of lower respiratory tract infections and hospitalization in infants and children. Whole genome sequencing (WGS) plays a critical role in understanding the evolution and epidemiology of RSV. Limited studies have been conducted in Central America and the Caribbean, and none have specifically focused on lineages involved in recent outbreaks. Furthermore, no assays currently exist to evaluate the sensitivity of the RSV fusion protein to monoclonal antibodies.

Methods: In Panama, an epidemiological surveillance system tracks RSV activity through the collection of nasopharyngeal samples from patients with acute respiratory infections. Between January 2018 and July 2024, 303 RSV-positive samples were analyzed by RT-qPCR. RSV-B was the dominant subgroup in 2018, but following years had alternating dominance between RSV-A and RSV-B. Of the 303 samples, 115 underwent WGS. Additionally, neutralization assays were done using different Anti-F Monoclonal Antibodies.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2025 The Author(s). *Influenza and Other Respiratory Viruses* published by John Wiley & Sons Ltd.

Results: In RSV-A, 11 lineages were identified, with 3 to 5 cocirculating during each annual outbreak, and a shift in predominance from A.D.1 (2019) to A.D.5.2 (2023–2024). In RSV-B, two lineages circulated: B.D.4.1.1 (2018–2020) and its descendant B.D.E.1, which predominated from 2021 onward. Several monoclonal antibodies, including nirsevimab's precursor MEDI8897*, effectively neutralized the RSV strains in neutralization assays.

Conclusions: Although Panama has not yet implemented a preventive therapy for RSV, this step could modify outbreak dynamics. The findings from this study provide a baseline reference prior to the implementation of preventive therapies against RSV in Panama and the region, facilitating the assessment of potential changes in the evolutionary dynamics of the virus.

1 | Introduction

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of severe acute respiratory infections (SARIs) in children worldwide. In Panama, RSV accounts for 21% of acute respiratory infections in children under 2 years of age, the highest incidence among respiratory viruses, with 10% of these cases requiring hospitalization [1].

RSV belongs to the Pneumoviridae family, *Orthopneumovirus* genus. It is an enveloped virus with a nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA genome of approximately 15.2 kb [2]. The genome consists of 10 genes encoding 11 proteins: nine structural and two nonstructural proteins. RSV has two antigenic subgroups, RSV-A and RSV-B, which were initially subdivided into several genotypes based on the attachment glycoprotein (G) gene [3]. Previous RSV surveillance in Panama (2008–2012), based on the G attachment glycoprotein sequence, identified the predominance of the GA2 genotype and the emergence of the ON1 variant (characterized by a 72-nucleotide insertion) in the RSV-A subgroup. Despite the observed genetic variability, the G protein remained antigenically stable [4]. In the RSV-B subgroup, this surveillance reported the emergence of the BA14 genotype [5]. More recently, with the advancement of next-generation sequencing platforms and bioinformatics analyses, and with the aim of standardizing classification and strengthening molecular surveillance, new classification systems for RSV have been proposed. These systems are based on phylogenetic associations derived from whole genome analysis [6, 7] and also incorporate information on amino acid signatures, proposing a transition from genotypes to lineages [8]. In Panama, comprehensive genomic data on circulating RSV strains are still lacking, and in fact, as of December 2024, genomic data from Central America and the Caribbean remain limited, representing less than 0.5% of all RSV genome submissions on the GISAID platform [9]. This scarcity of data hinders our ability to draw robust conclusions about RSV evolutionary dynamics in the region, especially in the context of the COVID-19 pandemic, which globally reduced RSV transmission and may have influenced viral diversity and selection [10, 11].

With the imminent implementation of preventive treatment against RSV in Panama and in other countries of the region [12–14], monitoring the genomic evolution will be decisive in the context of public health. Particularly important is tracking the evolution of the fusion F protein, the primary target for monoclonal antibodies (mAb) and vaccines [15]. The F protein

contains six antigenic sites (Ø, I–V) that have been widely studied [16, 17], which has enabled the development of neutralizing mAbs as a preventive treatment. Palivizumab was the first mAb authorized for RSV prophylaxis, and it targets antigenic site II [18]. The recently approved nirsevimab targets the Ø site and has a half-life of 150 days [19, 20]. Another novel mAb is clesrovimab (MK-1654), currently in the final stages of approval. It binds to the highly conserved antigenic site IV of the RSV F protein, emerging as an innovative tool for immunoprophylaxis [15, 21].

In this study, we present the first comprehensive analysis of RSV genomic evolution in Panama spanning the years 2018 to 2024. In addition, we integrate molecular epidemiology data with neutralization assays against the RSV F protein, demonstrating that the circulating lineages are sensitive to recently approved, preventive monoclonal antibodies. These findings not only advance local understanding but also provide critical insights for Central America, the Caribbean, and the global context, particularly regarding the implementation of RSV immunization strategies.

2 | Materials and Methods

2.1 | Ethics Statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama (219/CBI/ICGES/22 and amendment 300/CBI/ICGES/24).

2.2 | Epidemiological Surveillance System in Panama

Respiratory virus surveillance in Panama, established since 1976 [22], is currently conducted through the National Epidemiological Surveillance System for influenza-like illness (ILI) syndrome and SARIs. This system managed by the Ministry of Health includes 18 sentinel sites across the country: 8 for ILI and 10 for SARI (Figure 1) [23]. Each week, sentinel sites collect at least five nasopharyngeal swab (NPS) samples from suspected ILI and SARI cases, to be sent to the sentinel laboratories or to the National Influenza Center at the Gorgas Memorial Institute in Panama City [23]. This surveillance system seeks to ensure demographic representativity by including samples from all provinces in the country, temporal diversity

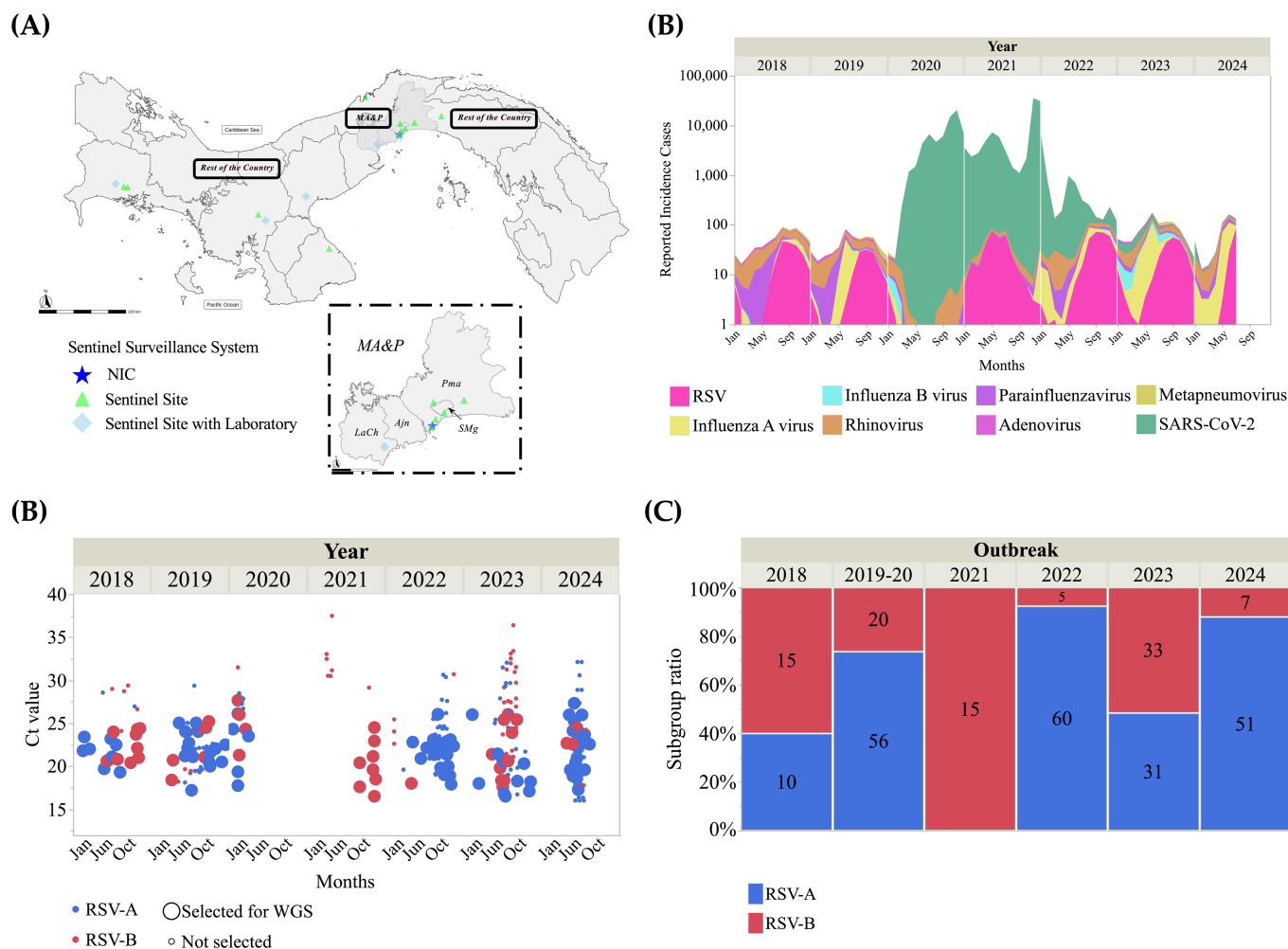


FIGURE 1 | (A) A geographic map of Panama is presented, showing the location of the institutions that collect samples for the National Epidemiological Surveillance System. This system consists of 18 sentinel sites, some of which have sentinel laboratories. Additionally, the location of the National Influenza Center, which is located in the MA&P area, is shown. (B) Respiratory virus surveillance by the National Epidemiological Surveillance System using real-time RT-qPCR. During 2020, with the onset of the COVID-19 pandemic, the system focused on detecting SARS-CoV-2, adopting universal surveillance. However, the monitoring of other respiratory viruses in samples from sentinel sites continued. (C) RT-qPCR Ct values of samples analyzed in this study of each RSV subgroup and selected for WGS. (D) RSV subgroup annual seasonality from 303 RSV-positive samples using real-time RT-PCR. The graphs were plotted in Jump Statistical Software 18.0.1. MA&P indicates metropolitan area and its periphery; Pma, Panama; SMg, San Miguelito; Ajn, Arraijan; LCh, La Chorrera; RSV, respiratory syncytial virus; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; RSV-A, respiratory syncytial virus subgroup A; RSV-B, respiratory syncytial virus subgroup B.

with sample collection throughout the entire season, and population diversity through the sampling of different age-groups and health conditions, covering both outpatient and hospitalized cases [23].

2.3 | Clinical Samples, Viral RNA Extraction, and RT-qPCR

Between January 2018 and July 2024, a total of 303 RSV clinical samples were retrospectively retrieved from the surveillance system biobank for further subgroup characterization and genome sequencing. The samples include 25 from 2018, 76 from 2019 to 20, 15 from 2021, 65 from 2022, 64 from 2023, and 58 from 2024. Total RNA was extracted using KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, Rocklin, CA, USA), and RSV subgroup was identified by RT-qPCR as previously described [24]. From them, a total 115

specimens with Ct < 28 were selected for further analysis, to ensure genome recovery.

2.4 | Whole Genome Sequencing (WGS)

WGS was performed as previously described [25]. Briefly, cDNA was generated using the SuperScript IV First-Strand Synthesis System (SSIV, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) with four RSV forward primers. Four independent PCR reactions were performed using Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) to generate four overlapping amplicons of approximately 4 kb length, spanning the complete RSV genome. Amplicons were verified on a 1% agarose gel, pooled, and used for library prep using Nextera XT library kit (Illumina, USA cat. FC-131-1096). Libraries were sequenced with a 2 × 250 paired-end run on an Illumina MiSeq sequencer.

2.5 | Next-Generation Sequencing Analysis

We filtered FASTQ files for reads with average quality score above Q30 and minimum length 200bp using Fastp (S. [26]). Complete genomes were generated by mapping the filtered FASTQ against the references RSV-A GenBank accession number ON237358.1 or RSV-B GenBank accession number ON237214.1 using gencomvariable v.2.0 pipeline (<https://github.com/AAMCgenomics/gencomvariable.git>).

2.6 | Phylogenetic Analysis

Complete reference genomes of RSV-A and RSV-B were downloaded from the RSV Genotyping Consensus Consortium (<https://github.com/rsv-lineages>) accessed on August 26, 2024 (supplemental material), and the sequences were compiled according to subgroups and then aligned using MAFFT v7.490 [27] and visualized with Aliview v1.28 [28]. The best nucleotide substitution model was evaluated with ModelFinder [29], and the maximum likelihood phylogenetic trees were inferred using IQ-TREE v2.2.0 [30, 31]. Branch support was assessed by 1000 ultrafast bootstrap iterations [31]. Trees were visualized with FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.7 | Viral Isolation

A total of 115 clinical samples selected for RSV whole genome sequencing (Ct < 28) were aliquoted and diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2% inactivated fetal calf serum (FCS) and used to infect HEP-2 cell monolayers in 12-well plates as previously described [32]. In the absence of cytopathic effect, cultures were subjected to up to five serial passages. When cytopathic effect was observed, cells were scraped into the medium, and the suspension was stored in liquid nitrogen. The presence of cytopathic effect was confirmed as RSV infection by RT-qPCR.

2.8 | Neutralization Assay

Neutralization assays were performed to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of three highly potent neutralizing antibodies: MEDI8897* (parental nirsevimab) [20]; motavizumab, a derivative of palivizumab with enhanced neutralizing potency [33, 34]; and AM14 [35], which binds to F protein similarly to Clesrovimab. As an irrelevant control, the anti-F metapneumovirus antibody MF14 [36] was included. The antibodies were tested against Panamanian viral strains that were isolated and previously characterized by WGS. Additionally, an RSV-A strain (NCBI Reference Sequence: NC_038235.1) and an RSV-B strain (MF443150.1) were included as controls.

The assay was performed in two replicates, in which various dilutions of the mAbs in DMEM supplemented with 2% inactivated FCS were incubated with 100 focus-forming units (FFUs) of RSV isolates at room temperature for 30 min. Then, 150 µL of these mixtures was used to infect 5 × 10⁴ HEP-2 cells in 96-well plates. After 48 h at 37 °C with 5% CO₂, the supernatant was removed, and the cells were fixed with cold methanol and 2% H₂O₂. For viral

antigen detection, a cocktail of murine mAbs against G protein (021/1G and 021/21G) [37] and F protein (47F, 101F, 56F, and 2F) [38, 39] was used. The labeled FFUs were stained using an immunohistochemistry assay with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500 in 1% BSA) as the secondary antibody. For visualization, 750 µL of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) was used as the substrate (20 mg of AEC, Sigma-Aldrich; dissolved in 6 mL of 100% DMSO), prepared in 12 mL of 0.05 M citrate-phosphate buffer with 25 µL of 30% H₂O₂. The reaction was incubated for at least 2 h at room temperature, protected from direct light. Finally, the FFUs were counted under an inverted microscope.

IC₅₀ values were calculated by fitting experimental data to a four-parameter sigmoidal equation (4PL) using Microsoft Excel [40] (supplemental material).

3 | Results

3.1 | Epidemiology of RSV in Panama From 2018 to 2024

From January 2018 to July 2024, Panama Epidemiological Surveillance System detected 5702 cases of RSV infection in patients of all ages, representing 39.5% of the viruses identified during this period, excluding SARS-CoV-2 cases (Figure 1). The male-to-female ratio among these cases was 58.1%, and the ratio of hospitalized to outpatient cases was 67.0%, including one fatal case. Age distribution of cases was as follows: <1 year (55.8%), 1–4 years (35.6%), 5–50 years (6.6%), and > 50 years (1.3%) (Table 1). A total of 56.4% of the samples came from the metropolitan area and its periphery (MA&P), which in this study includes the districts of Panama, San Miguelito, Arraijan, and La Chorrera (Table 1). These four districts are among the most populated in the country and share a close social dynamic characterized by constant exchange due to commerce, work, and education [41].

Respiratory virus incidence in Panama is recorded year-round, with influenza virus, RSV, rhinovirus, and, more recently, SARS-CoV-2 representing the predominant circulating pathogens (Figure 1). RSV case detection typically increases during the rainy season, which spans the second half of the year (Figure 1). However, in 2020, RSV circulation was disrupted due to the implementation of strict mitigation measures to contain the spread of SARS-CoV-2, including the use of face masks, social distancing, and school closures. The samples collected in 2020 were detected during the first 3 months of the year, prior to the onset of the COVID-19 pandemic, and are therefore linked to the 2019–2020 RSV outbreak (Figure 1). However, in 2021, the relaxation of COVID-19 mitigation measures led to a resurgence of RSV cases, with detection occurring throughout the entire year (Table 1). The subset of samples that underwent genome sequencing (Ct < 28) did not differ in demographic characteristics from the original cohort (Figure 1) (Table S1).

3.2 | Predominance and Dynamics of Subgroups and Lineages

From 2018 to 2024, the RSV-A and the RSV-B subgroups alternated the predominance in the epidemic outbreaks in Panama

TABLE 1 | RSV-positive samples by subgroup (A and B), and patient characteristics during the epidemic outbreaks from 2018 to 2024 in Panama.

	RSV—epidemic outbreaks												Total RSV-A	Total RSV-B	Total (%)
	2018		2019–2020		2021		2022		2023		2024				
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B			
Total	10	15	56	20	0	15	60	5	31	33	51	7	208	95	303 (100)
Gender															
Male	6	6	31	9	0	10	34	2	19	24	30	5	120	56	176 (58.1)
Female	4	9	25	11	0	5	26	3	12	8	21	2	88	38	126 (41.6)
N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.3)
Clinical status*															
Hospitalized	10	15	53	17	0	4	7	2	21	18	48	7	139	63	202 (66.7)
Outpatient	0	0	3	2	0	11	53	3	9	13	3	0	68	29	97 (32.0)
Deceased	0	0	0	1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1**	1 (0.3)
N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	2	3 (1.0)
Patient age*, years															
<1	9	13	38	16	0	4	28	2	14	15	27	3	116	53	169 (55.8)
1–4	1	2	17	4	0	8	24	3	9	14	22	4	73	35	108 (35.6)
5–50	0	0	1	0	0	2	6	0	6	3	2	0	15	5	20 (6.6)
>50	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	2	2	4 (1.3)
N/A	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (0.7)
Geographic area															
MA&P	5	5	17	6	0	9	50	4	21	10	38	6	131	40	171 (56.4)
Rest of the country	5	10	39	14	0	6	10	1	10	23	13	1	77	55	132 (43.6)

Note: Number of samples analyzed by RT-PCR for each epidemic outbreak studied: 2018 ($N=25$), 2019–20 ($N=76$), 2021 ($N=15$), 2022 ($N=65$), 2023 ($N=64$), 2024 ($N=58$).
Abbreviation: RSV, respiratory syncytial virus; A, RSV subgroup A; B, RSV subgroup B; N/A, information not available; MA&P, metropolitan area and its periphery.
*In 2021 and 2022, the majority of recorded patients were outpatient cases, including some individuals older than 5 years old likely due to the focus on COVID-19 diagnostics, with samples primarily from ILI sentinel units. However, the RSV surveillance has been historically biased toward the hospitalized pediatric population.
**Six-month-old patient; no further information about clinical status or comorbidities could be obtained.

(Figure 1). However, in 2021, the number of samples analyzed was limited, and all of them corresponded to RSV-B. We found no association between subgroups and patient gender, clinical status, or age (Fisher's exact test, $p>0.1$). However, we found an association between subgroups and geographic zones (Fisher's exact test, $p=0.0011$), which was driven by the cases during 2023 (Fisher's exact test, $p=0.0056$), suggesting that there was an opposite subgroup predominance in MA&P region compared with the rest of the country in the 2023 season. In this epidemic outbreak, 67.7% of RSV-A cases were concentrated in MA&P, whereas similarly, 69.7% of RSV-B cases were located in the rest of the country.

Phylogenetic analysis of subgroup A genomes identified 11 distinct RSV-A lineages, with evidence of cocirculation of three to five lineages during each annual outbreak (Figure 2).

Several RSV-A lineages detected prior to the COVID-19 pandemic, including A.D.2.2, A.D.2.2.1, and A.D.5, were not identified in samples collected after 2020. In turn, subgroup B phylogenetic analysis showed the circulation of two RSV-B lineages: B.D.4.1.1 in 2018 and 2019–2020, and since 2021, the descendant lineage B.D.E.1 was detected cocirculating and prevailing to B.D.4.1.1 (Figure 2).

Geographical analysis of lineage distribution revealed that lineages A.D.1.7, A.D.3.2, A.D.3.3, A.D.5.2, and B.D.E.1 were initially identified in the metropolitan area and Panama (MA&P) (Figure 3) (Table S2), which is the most densely populated area. This area may serve as a focal point for the introduction and subsequent spread of the lineages. We found geographically limited transmission for some lineages within RSV-A and RSV-B lineages (chi-square test, $p=0.033$ and $p=0.0001$, respectively) (Table S3).

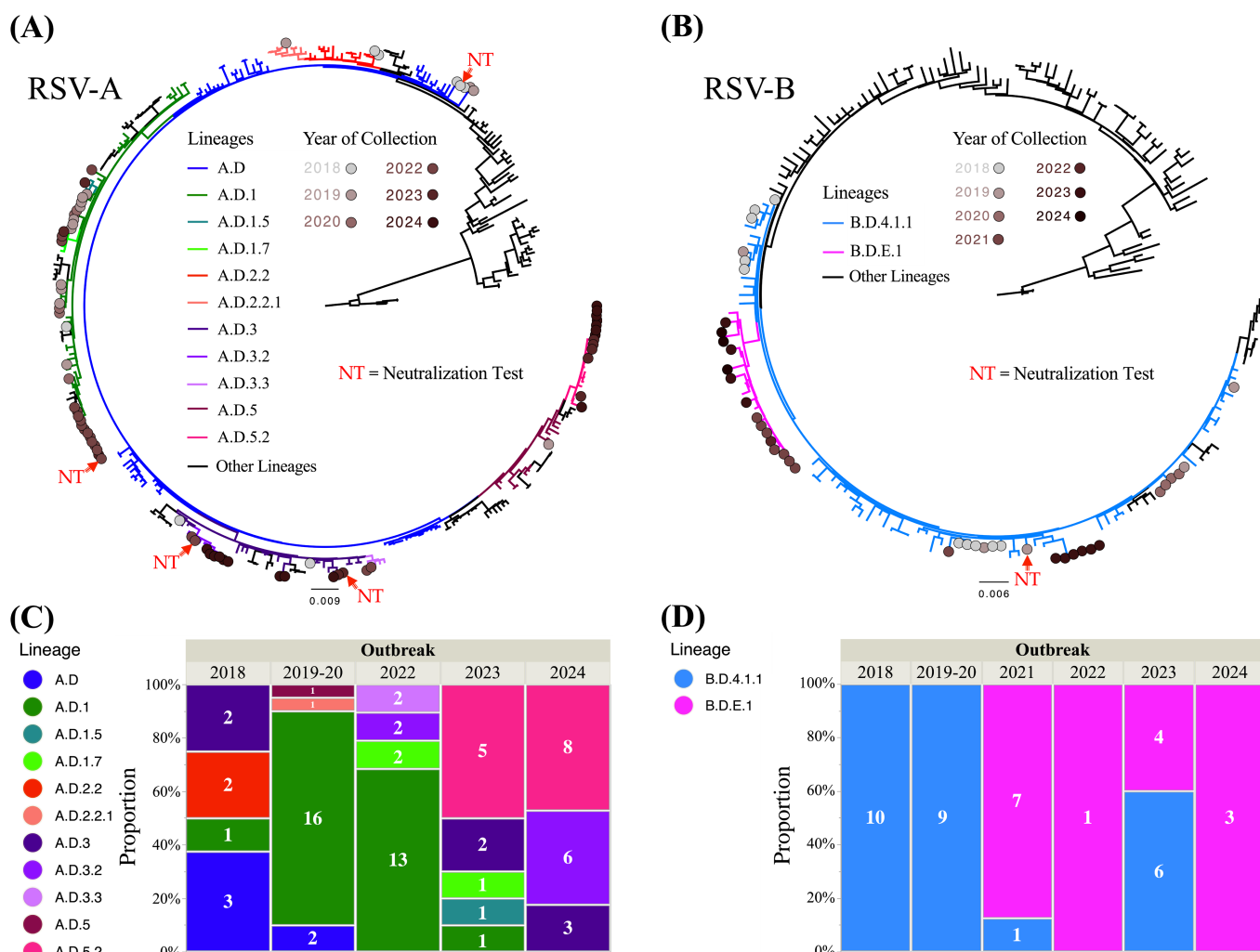


FIGURE 2 | Maximum likelihood phylogenetic trees of the complete genomes of RSV-A (A) and RSV-B (B) grouped with reference strains. The RSV genomes from Panama are highlighted with circles ranging from light gray (2018) to dark red (2024) at the tips of the branches. The RSV subgroups are represented by the colors of the tree branches. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Inside the box, stacked bar graphs for RSV-A (C) and RSV-B (D) represent the RSV lineages identified during the study year, with the label on each bar corresponding to the number of genomes obtained. Maximum likelihood phylogenetic trees based on the Fusion protein gene are presented in Figure S1. The graph was plotted in Jump Statistical Software 18.0.1. RSV-A indicates respiratory syncytial virus subgroup A; RSV-B, respiratory syncytial virus subgroup B.

The 13 RSV lineages found in the study were detected in children under 5 years of age, but only five lineages in individuals older than 5 years old (Table S4). For RSV-A lineages, the chi-square test did not reveal a significant association with hospitalization ($p=0.091$; Table S3). Within the RSV-B subgroup, the B.D.4.1.1 lineage was predominantly associated with hospitalized cases (Fisher's exact test, $p=0.004$) and was also detected in the single deceased patient, whereas the B.D.E.1 lineage was more frequently observed in outpatient cases.

3.3 | Sensitivity of Current RSV Strains to Monoclonal Antibodies

To assess the sensitivity of RSV strains detected in Panama to mAbs MEDI8897*, motavizumab, and AM14, we successfully isolated 18 RSV-A from different lineages (one A.D., thirteen A.D.1, three A.D.3, and one A.D.3.2) and one RSV-B (B.D.4.1.1). Unfortunately, it was not possible to obtain viable isolates from all detected lineages, which limited the

scope of the neutralization assays, also representing a pending aspect that should be addressed in future studies. The RT-qPCR Ct values of the NPS from which viral isolation was achieved ranged between 16.8 and 24.8, with a median of 20.8 (Table S5). We aimed to include strains representing the greatest genetic diversity; however, due to the inherent limitations of RSV isolation, only representative strains from clades A.D, A.D.1, A.D.3.2, A.D.3, and B.D.4.1.1 could be obtained for further analysis. The selected strains were hRSV/A/Panama/ICGES-215/2018 (A.D), hRSV/A/Panama/ICGES-45/2022 (A.D.1), hRSV/A/Panama/ICGES-42/2022 (A.D.3.2), hRSV/A/Panama/ICGES-147/2023 (A.D.3), and hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019 (B.D.4.1.1) (Figure 2). All five isolates exhibited significant sensitivity to the mAbs, but especially to MEDI8897* with an IC_{50} range of 0.30–6.99 ng/mL, 6.56–14.97 ng/mL for AM14, and 13.15–69.79 ng/mL for motavizumab (Table 2) (Figure S2).

Interestingly, RSV-B hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019 (lineage B.D.4.1.1) demonstrated the highest sensitivity to

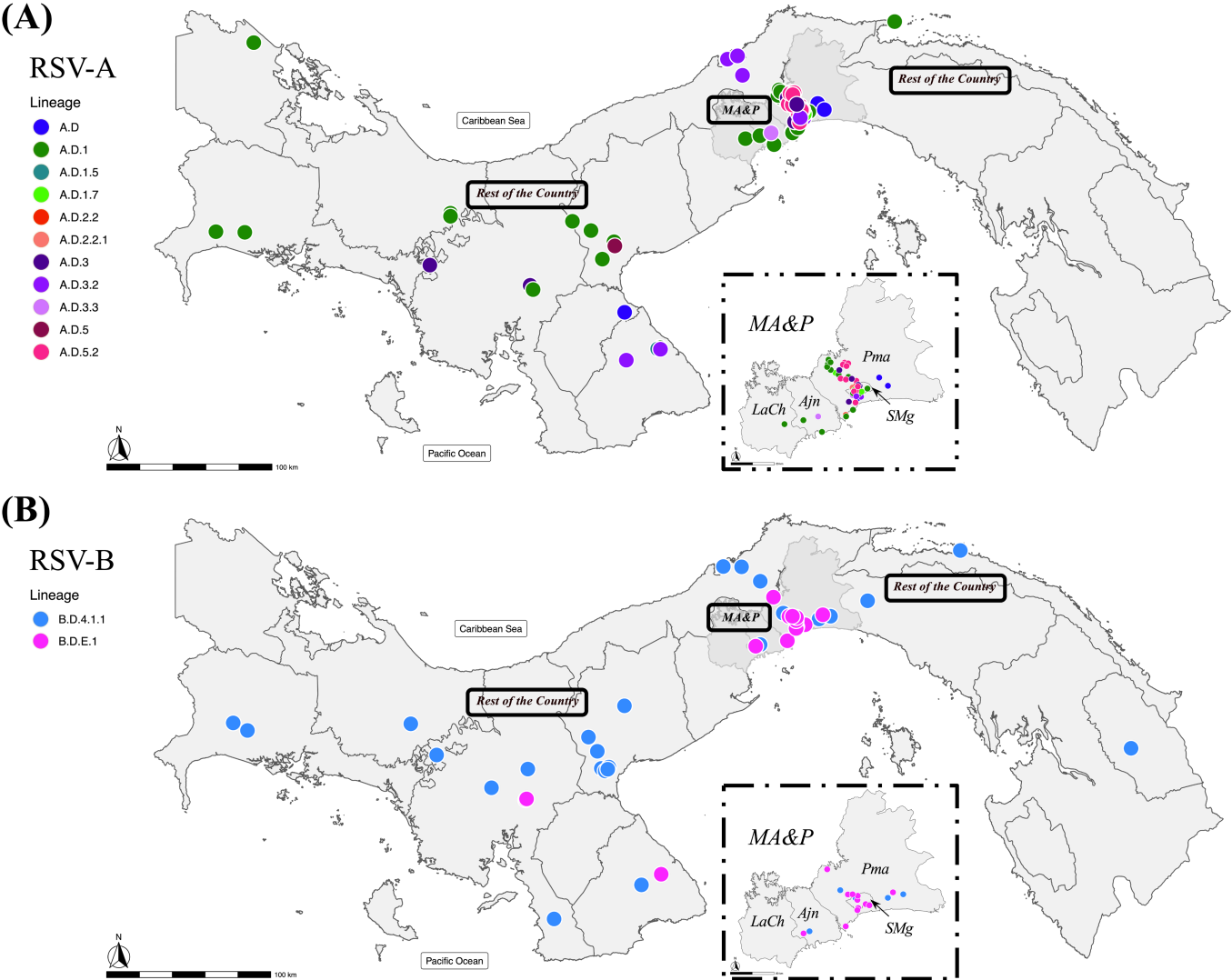


FIGURE 3 | A geographic map of Panama is presented showing the location of the lineages found for RSV-A (A) and RSV-B (B) in the epidemic outbreaks studied. The map was generated using R software 4.1.0. RSV-A, respiratory syncytial virus subgroup A; RSV-B, respiratory syncytial virus subgroup B; MA&P, metropolitan area and its periphery; Pma, Panama; SMg, San Miguelito; Aja, Arraijan; LCh, La Chorrera.

TABLE 2 | Determination of IC₅₀ of mAbs (ng/mL) targeting the F protein of RSV in Panamanian RSV strains isolated from 2018 to 2023.

Strain name	Monoclonal antibodies (mAbs)		
	MEDI8897*	AM14	MOTAVIZUMAB
hRSV/A/Panama/ICGES-215/2018 (A.D.)	2.55	6.56	13.15
hRSV/A/Panama/ICGES-45/2022 (A.D.1)	6.99	11.19	35.30
hRSV/A/Panama/ICGES-42/2022 (A.D.3.2)	6.41	10.27	69.79
hRSV/A/Panama/ICGES-147/2023 (A.D.3)	5.85	14.97	49.85
hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019 (B.D.4.1.1)	0.30	12.10	41.66
hRSV/A/A2 strain (control)	1.22	7.00	25.84
hRSV/B/GM3.5/Spain (control)	3.15	4.52	35.87

Note: RSV lineage for each strain is detailed between parentheses. The statistical analysis of the Panamanian isolates showed that MEDI8897* had an IC₅₀ (ng/mL) average of 4.42 ng/mL (95% confidence interval [CI], 0.85–7.99). In turn, AM14 showed an IC₅₀ of 11.02 ng/mL (95% CI, 7.23–14.81), and motavizumab an IC₅₀ of 41.95 ng/mL (95% CI, 16.27–67.63). The irrelevant control MF14 (anti-F metapneumovirus) showed an IC₅₀ > 1666 ng/mL. Control strains included were RSV-A A2 (NC_038235.1, genotype A2, lacking the 72-nt insertion in the G gene) and RSV-B GM3.5/Spain (MF443150.1, genotype BA, carrying the 60-nt insertion in the G gene).
Abbreviation: IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration.

MEDI8897*, with an IC_{50} of 0.30 ng/mL. RSV-A strains showed slight variability in sensitivity to MEDI8897*, with IC_{50} values ranging from 2.55 ng/mL for hRSV/A/Panama/ICGES-215/2018 (A.D) to 6.99 ng/mL for hRSV/A/Panama/ICGES-45/2022 (A.D.1) (Table 2).

A detailed analysis of the F protein sequence in isolated RSV-A strains revealed amino acid substitutions at the binding sites compared with the NCBI GenBank reference strain (accession number NC_038235). No substitutions were observed in the nirsevimab binding site. In the motavizumab binding site, the strains hRSV/A/Panama/ICGES-215/2018, hRSV/A/Panama/ICGES-45/2022, and hRSV/A/Panama/ICGES-147/2023 showed the N276S substitution. By contrast, the strain hRSV/A/Panama/ICGES-42/2022 regained the asparagine at this position, highlighting its importance as a lineage-defining amino acid [8]. In the clersovimab binding site, which is similar to that of AM14, all RSV-A strains shared the M447V substitutions. Furthermore, multiple substitutions were identified in other regions of the F protein, including L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, and S540A. Moreover, T12I was detected in the strains hRSV/A/Panama/ICGES-42/2022 and hRSV/A/Panama/ICGES-147/2023, underscoring its relevance in this lineage (lineage-defining amino acid) [8]. A comparison of these findings with current GISAID reference strains is provided in Table S5.

On the other hand, the RSV-B strain hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019 exhibited a distinct pattern of amino acid substitutions when analyzed against the NCBI GenBank reference strain (accession number NC_001781). In the nirsevimab binding site, the substitutions I206M and Q209R were identified, whereas no changes were observed in the motavizumab binding site or the clersovimab binding site. In other regions of the F protein, additional substitutions were detected, including L8S, F45L, A103V, L172Q, S173L, K191R, N234T, and T529A, which could be associated with specific adaptations of this strain. The amino acid sequence of the analyzed Panamanian RSV-B strain is 100% homologous to the F protein of the hRSV/B/Australia/VIC-RCH056/2019 strain (EPI_ISL_1653999), with the latter being the EpiRSV reference (GISAID) (Table S5).

4 | Discussion

This study offers a detailed overview of RSV genotypic and phenotypic characteristics in Panama over the last 7 years. Our findings reveal alternating predominance between RSV-A and RSV-B subgroups, the emergence and cocirculation of diverse lineages, and high sensitivity of current RSV strains to monoclonal antibodies, including MEDI8897*, a nirsevimab parental. Our study underscores the RSV epidemiology and potential responses to emerging prevention strategies, particularly as Panama is a critical global trade hub and tourism destination, which may affect viral introductions and circulation.

The National Epidemiological Surveillance System has recorded, between 2018 and 2024, a significant incidence of cases attributed to RSV, with clearly identified annual epidemic outbreaks. These outbreaks have historically been associated with the rainy season in tropical climates [42], which is

consistent with the climate of our country and with the findings of this study. In March 2020, following the confirmation of the first COVID-19 case in Panama, the government implemented strict containment measures, such as school closures, social distancing, and curfews [43]. As also happened in other countries, these interventions had the additional effect of disrupting the transmission of other respiratory viruses, except for rhinovirus [44, 45]. However, RSV resurged in Panama in 2021, with year-long detections, as was also reported in other regions [46, 47]. This shows the sensitivity of RSV epidemiology to changes in social behavior and highlights the importance of maintaining an active viral surveillance systems, even in the context of pandemic-related disruptions. The metropolitan area of Panama City, a densely populated region and a focal point for international travel through its airport and the Panama Canal, showed the most diverse RSV circulation, suggesting a connection between population density, travel, and viral introductions. Comparable patterns have been documented in urban centers worldwide, where newly emerging RSV lineages are typically introduced in densely populated urban areas prior to dissemination into peripheral or less populated regions [48]. This observation also aligns with previous studies suggesting that RSV transmission and geographic spread are predominantly driven by air travel [49].

We observed an alternating pattern of annual subgroup replacement between RSV-A and RSV-B. This phenomenon has been documented in other regions of the world [50, 51]. Such subgroup replacement patterns may be attributed to antigenic drift inducing viral fitness, or fluctuations in population immunity following previous outbreak [25]. Our study found that RSV-B predominated in 2021, likely due to the introduction the B.D.E.1 lineage. The predominance would be also favored by reduced viral exposure during the pandemic [52, 53]. Conversely, in 2022, RSV-A became the predominant subgroup. This shift may be linked to herd immunity from prior RSV-B outbreak [25]. Notably, different patterns have been reported in other regions of the world: in Europe, RSV-A predominated in 2021, whereas RSV-B predominated during the 2022/2023 epidemic [54–56]. However, in New Zealand, immediately after the pandemic (2021), both subgroups re-emerged simultaneously without a clear predominance [10]. These observations, in concordance with previous reports [24], highlight that the distribution of RSV subgroups may vary according to the region.

Overall, our observations regarding the lineages detected in the last six epidemic outbreaks in Panama are consistent with reports globally [11, 57–59]. These studies have documented that the reintroduction of RSV following preventive measures against COVID-19 showed a gradual recovery of transmission patterns, with a postpandemic predominance or significant presence of the A.D.1 and AD.5.2 lineages in RSV-A, and B.D.4.1.1 and B.D.E.1 in RSV-B. Moreover, our study showed that RSV-A had greater genetic diversity than RSV-B, as evidenced by the higher number of cocirculating lineages. This observation aligns with reports of RSV-A exhibiting a substantially greater variety of lineages in circulation compared with RSV-B across multiple countries over several years [49].

In addition, an association was observed between the RSV-B lineage B.D.4.1.1 and increased hospitalization rates, including its

identification in a fatal case of RSV infection. Although more research is needed to definitively link RSV lineages with disease severity, studies have found that specific postpandemic RSV strains have been associated with greater clinical severity [55, 60]. Therefore, understanding these associations between RSV subgroups driven by different lineages is essential for anticipating public health burdens in future RSV seasons and developing targeted interventions.

The sensitivity of RSV strains to three monoclonal antibodies—MEDI8897* (parental nirsevimab), motavizumab, and AM14—was also evaluated. Promisingly, all tested RSV strains, regardless of lineage, were highly sensitive to these antibodies. Additionally, the IC_{50} values obtained in our study are very similar and comparable with those reported in previous studies, supporting the high potency of these antibodies in neutralizing the virus [20]. Although strains with up to 20 substitutions in the F protein compared with the reference strain were identified (Table S5), the antigenic sites targeted by the studied mAbs remained highly conserved. This is consistent with a previous report indicating that, between 2015 and 2021, the nirsevimab binding site remained highly conserved in RSV-A (100%) and in 88% of the positions in RSV-B. Similarly, the key antigenic sites (Ø and II) remained stable throughout the entire study period (1956–2021), highlighting the relevance of these sites in the efficacy of monoclonal antibodies [61]. Notably, the hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019 strain from the lineage B.D.4.1.1 showed the highest sensitivity to nirsevimab, with an IC_{50} of 0.30 ng/mL. This high susceptibility is attributable to the I206M and Q209R substitutions located in antigenic site Ø of the F protein. Recent studies suggest that these substitutions enhance electrostatic interactions between the antigenic site and nirsevimab, significantly improving its viral neutralization capacity [62]. The fact that lineages such as B.D.4.1.1, which were associated with increased hospitalizations and a fatal case in our study, are highly susceptible to nirsevimab suggests that susceptibility to monoclonal antibodies may be independent of any potential correlation with disease severity. However, it is important to highlight that the B.D.4.1.1 lineage detected in this study in 2023 once again has a Glutamine at position 209. Additionally, the B.D.E.1 strains present an S211N substitution (a lineage-defining amino acid) [8]. The absence of B.D.E.1 isolates could be due to a low amount of viable virus in the clinical samples and/or specific characteristics of this lineage that may hinder its isolation. Despite these recent substitutions, previous studies confirm that RSV-B strains remain sensitive to nirsevimab [62]. These findings suggest that the implementation of nirsevimab, or another preventive treatment with proven safety and efficacy, could be highly effective in Panama, particularly in preventing severe cases and deaths associated with RSV.

The effectiveness of these antibodies, combined with genomic surveillance, will be critical in predicting the future success of RSV vaccines and therapeutic interventions. As monoclonal antibodies and vaccines are rolled out in Panama and other regions, active viral genomic surveillance will be essential to predict their effectiveness to fight RSV, and at the same time evaluate whether and how their implementation in Panama and globally might pressure RSV evolution.

5 | Conclusions

This study provides a comprehensive analysis of RSV evolution in Panama over the past 7 years. Our results reveal considerable genetic diversity in RSV-A compared with RSV-B, with the cocirculation of multiple lineages in each annual outbreak. In addition, the impact of the COVID-19 pandemic on RSV circulation in 2020 is evident, along with atypical seasonality in 2021 and the emergence and replacement of lineages in subsequent years. All tested RSV strains were neutralized by monoclonal antibodies, especially by the parental antibody of nirsevimab, which highlights the potential of these treatments to reduce RSV disease severity. However, the interpretation of these findings should consider certain study limitations, particularly the restricted availability of clinical samples and the challenges in obtaining isolates representative of all circulating lineages. Continuous surveillance and molecular characterization of these strains are essential, especially when preventive interventions are implemented, and, in a hypothetical worst-case scenario, variants with immune escape mechanisms could emerge.

Author Contributions

Danilo Franco: investigation, methodology, data curation, visualization, writing – original draft, conceptualization. **Stephanie Goya:** validation, methodology, formal analysis, visualization, writing – review and editing. **Alexander Martínez:** validation, methodology, formal analysis, visualization, writing – review and editing. **Vicente Mas:** investigation, writing – review and editing, resources, methodology, supervision. **Brechla Moreno:** investigation, resources, investigation, resources, investigation, resources. **Elimelec Valdespino:** investigation, resources. **Melissa Gaitán:** investigation, resources. **Lisbeth Sáenz:** investigation, resources. **Claudia González:** investigation, resources. **Ambar Moreno:** investigation, resources, investigation, resources, investigation, resources. **Zeuz Capitan-Barrios:** validation, project administration, visualization, writing – review and editing. **Jean Paul Carrera:** validation, formal analysis, writing – review and editing. **Sandra López-Vergès:** validation, writing – review and editing, formal analysis. **Juan Miguel Pascale:** investigation, writing – review and editing, resources. **Yadira Moltó:** investigation, resources. **Lourdes Moreno:** investigation, resources, investigation, resources, investigation, resources. **Belmaris Rizo:** investigation, resources. **Enrique Urriola:** investigation, resources. **Teresa Delgado:** investigation, resources. **María Iglesias-Caballero:** investigation, resources. **Inmaculada Casas:** supervision, resources. **Suman R. Das:** investigation, resources, resources, investigation. **Juan Arbiza:** supervision, writing – review and editing. **Adriana Delfraro:** supervision, resources, writing – review and editing, validation, visualization. **Leyda Ábrego:** conceptualization, funding acquisition, supervision, methodology, formal analysis, visualization, writing – review and editing.

Acknowledgments

We extend our gratitude to all current and former personnel of the National Influenza Center of Panama, as well as to those who have participated across the different levels of the National Epidemiological Surveillance System for influenza-like illness and severe acute respiratory infections, for their dedication and commitment. This work was supported by grant FID22-106 from SENACYT-Panamá, EU4H-2022-DGA-MS-IBA-01-02-101113109, UNESPA “COVIDSEQ-UNESPA” (MPY 226/22), and FIS grant numbers PI21CIII/00019 and PI22CIII/00054 from the Carlos III Institute, Spain.

Conflicts of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflicts of interest.

Data Availability Statement

RSV whole genomes from this study are available in EpiRSV (GISAID) (accession numbers EPI_ISL_19423081-EPI_ISL_19423195) and NCBI GenBank (accession numbers PQ618008-PQ618122).

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1111/irv.70173>.

References

1. E. Azziz-Baumgartner, L. M. Duca, R. González, et al., "Incidence of Respiratory Virus Illness and Hospitalizations in a Panama and El Salvador Birth Cohort, 2014–2018," *Lancet Regional Health—Americas* 13 (2022): 100304, <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100304>.
2. B. Rima, P. Collins, A. Easton, et al., & Consortium, I. R "ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae," *Journal of General Virology* 98, no. 12 (2017): 2912–2913, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000959>.
3. T. C. T. Peret, C. B. Hall, K. C. Schnabel, J. A. Golub, and L. J. Anderson, "Circulation Patterns of Genetically Distinct Group a and B Strains of Human Respiratory Syncytial Virus in a Community," *Journal of General Virology* 79, no. 9 (1998): 2221–2229.
4. A. Trento, L. Ábrego, R. Rodríguez-Fernández, et al., "Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group a) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?," *Journal of Virology* 89, no. 15 (2015): 7776–7785.
5. L. E. Ábrego, A. Delfraro, D. Franco, et al., "Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus Group B in Panama Reveals a Novel Genotype BA14," *Journal of Medical Virology* 89, no. 10 (2017): 1734–1742.
6. J. Chen, X. Qiu, V. Avadhanula, et al., "Novel and Extendable Genotyping System for Human Respiratory Syncytial Virus Based on Whole-Genome Sequence Analysis," *Influenza and Other Respiratory Viruses* 16, no. 3 (2022): 492–500, <https://doi.org/10.1111/irv.12936>.
7. K. Ramaekers, A. Rector, L. Cuyppers, P. Lemey, E. Keyaerts, and M. van Ranst, "Towards a Unified Classification for Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes," *Virus Evolution* 6, no. 2 (2020): 1–10, <https://doi.org/10.1093/ve/veaa052>.
8. S. Goya, C. Ruis, R. A. Neher, et al., "Standardized Phylogenetic Classification of Human Respiratory Syncytial Virus Below the Subgroup Level," *Emerging Infectious Diseases* 30, no. 8 (2024): 1631–1641, <https://doi.org/10.3201/eid3008.240209>.
9. GISAID Initiative. (n.d.). Retrieved December 30, 2024, from <https://www.epicov.org/epi3/frontend#320982>.
10. L. Jelley, J. Douglas, M. O'Neill, et al., "Spatial and Temporal Transmission Dynamics of Respiratory Syncytial Virus in new Zealand Before and After the COVID-19 Pandemic," *Nature Communications* 15, no. 1 (2024): 9758, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53998-5>.
11. A. Rice, G. Gonzalez, M. Carr, et al., "Human Respiratory Syncytial Virus Genetic Diversity and Lineage Replacement in Ireland pre- and Post-COVID-19 Pandemic," *Microbial Genomics* 11, no. 3 (2025): 1–14, <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001379>.
12. O. Arguedas-Arguedas, "Estrategias de Prevención Contra Virus Respiratorio Sincicial en Costa Rica: Buenas Noticias Para el 2025," *Acta Médica Costarricense* 66, no. 2 (2024): 1–3, <https://doi.org/10.51481/amc.v66i2.1449>.
13. C. Reyes La Dirección Nacional de Farmacias y Drogas Aprueba Nirsevimab Para Proteger a los Bebés Contra la Enfermedad por Virus Sincicial Respiratorio en Panamá. (2024), https://www.sanofi.com/asets/countries/pacifico/docs/241220_Comunicado-Sanofi_Aprobacion-Nirsevimab.pdf.
14. X. Sáez-Llorens, C. L. Castillo, D. Franco, R. Esquivel, K. Luciani, and R. DeAntonio, "Immunization Strategies Against Respiratory Syncytial Virus in Panama: Considerations for Decision-Making in a Tropical Country—A Working Group Meeting Report," *Frontiers in Public Health* 13 (2025): 1–6, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1547875>.
15. PATH. RSV Vaccine and mAb Snapshot. (2024), <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>.
16. V. Mas, H. Nair, H. Campbell, J. A. Melero, and T. C. Williams, "Antigenic and Sequence Variability of the Human Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein Compared to Related Viruses in a Comprehensive Dataset," *Vaccine* 36, no. 45 (2018): 6660–6673, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.09.056>.
17. J. S. McLellan, Y. Yang, B. S. Graham, and P. D. Kwong, "Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes," *Journal of Virology* 85, no. 15 (2011): 7788–7796, <https://doi.org/10.1128/jvi.00555-11>.
18. J. C. G. Blanco, M. S. Boukhvalova, T. G. Morrison, and S. N. Vogel, "A Multifaceted Approach to RSV Vaccination," in *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, vol. 14, Issue 7 (Taylor and Francis Inc., 2018), 1734–1745, <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1472183>.
19. J. B. Domachowske, A. A. Khan, M. T. Esser, et al., "Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MEDI8897, an Extended Half-Life Single-Dose Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody Administered as a Single Dose to Healthy Preterm Infants," *Pediatric Infectious Disease Journal* 37, no. 9 (2018): 886–892, <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001916>.
20. Q. Zhu, J. S. McLellan, N. L. Kallewaard, et al., "A Highly Potent Extended Half-Life Antibody as a Potential RSV Vaccine Surrogate for all Infants," *Science Translational Medicine* 9 (2017): eaaj1928.
21. A. Tang, Z. Chen, K. S. Cox, et al., "A Potent Broadly Neutralizing Human RSV Antibody Targets Conserved Site IV of the Fusion Glycoprotein," *Nature Communications* 10, no. 1 (2019): 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12137-1>.
22. E. Quiroz, B. Gómez, P. H. Peralta, and W. C. Reeves, "Actividad del virus influenza en la región metropolitana de la Ciudad de Panamá, 1976-1986 [Activity of Influenza Virus in the Metropolitan Region of Panama City, 1976-1986]," *Revista Médica de Panamá* 12, no.3 (1987): 189–194.
23. P. MINSA Normas y Procedimientos—Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Síndrome Gripal o Gripe o Influenza Y de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves. (2017), https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/norma_nacional_de_vigilancia_virus_respiratorios.pdf.
24. D. E. Tabor, F. Fernandes, A. C. Langedijk, et al., "Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus From the 2017–2018 INFORM-RSV Study," *Journal of Clinical Microbiology* 59, no. 1 (2020): e01828–20.
25. S. Goya, M. F. Lucion, M. H. Shilts, et al., "Evolutionary Dynamics of Respiratory Syncytial Virus in Buenos Aires: Viral Diversity, Migration, and Subgroup Replacement," *Virus Evolution* 9, no. 1 (2023): vead006, <https://orcid.org/0000-0003-2496-9724>.
26. S. Chen, Y. Zhou, Y. Chen, and J. Gu, "Fastp: An Ultra-Fast all-In-One FASTQ Preprocessor," *Bioinformatics* 34, no. 17 (2018): i884–i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
27. K. Katoh and D. M. Standley, "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability,"

- Molecular Biology and Evolution* 30, no. 4 (2013): 772–780, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
28. A. Larsson, “AliView: A Fast and Lightweight Alignment Viewer and Editor for Large Datasets,” *Bioinformatics* 30, no. 22 (2014): 3276–3278, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.
29. S. Kalyaanamoorthy, B. Q. Minh, T. K. F. Wong, A. Von Haeseler, and L. S. Jermiin, “ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates,” *Nature Methods* 14, no. 6 (2017): 587–589.
30. B. Q. Minh, H. A. Schmidt, O. Chernomor, et al., “IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic era,” *Molecular Biology and Evolution* 37, no. 5 (2020): 1530–1534, <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
31. L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, A. Von Haeseler, and B. Q. Minh, “IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies,” *Molecular Biology and Evolution* 32, no. 1 (2015): 268–274, <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
32. O. García, M. Martín, J. Dopazo, et al., “Evolutionary Pattern of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup a): Circulating Lineages and Correlation of Genetic and Antigenic Changes in the G Glycoprotein,” *Journal of Virology* 68, no. 9 (1994): 5448–5459, <https://doi.org/10.1128/JVI.68.9.5448-5459.1994>.
33. O. Cingoz, “Motavizumab,” *MAbs* 1, no. 5 (2009): 439–442, <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9496>.
34. S. O’Hagan, N. Galway, M. D. Shields, P. Mallett, and H. E. Groves, “Review of the Safety, Efficacy and Tolerability of Palivizumab in the Prevention of Severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) Disease,” in *Drug, Healthcare and Patient Safety*, vol. 15 (Dove Medical Press Ltd., 2023), 103–112, <https://doi.org/10.2147/DHPS.S348727>.
35. M. S. A. Gilman, S. M. Moin, V. Mas, et al., “Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein,” *PLoS Pathogens* 11, no. 7 (2015): e1005035, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005035>.
36. M. B. Battles, V. Más, E. Olmedillas, et al., “Structure and Immunogenicity of pre-Fusion-Stabilized Human Metapneumovirus F Glycoprotein,” *Nature Communications* 8, no. 1 (2017): 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01708-9>.
37. I. Martínez, J. Dopazo, and J. A. Melero, “Antigenic Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein and Relevance of Hypermutation Events for the Generation of Antigenic Variants,” *Journal of General Virology* 78, no. Pt 10 (1997): 2419–2429, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2419>.
38. B. García-Barreno, C. Palomo, C. Peñas, T. Delgado, P. Perez-Breña, and J. A. Melero, “Marked Differences in the Antigenic Structure of Human Respiratory Syncytial Virus F and G Glycoproteins,” *Journal of Virology* 63, no. 2 (1989): 925–932, <https://doi.org/10.1128/JVI.63.2.925-932.1989>.
39. S. J. Wu, A. Schmidt, E. J. Beil, et al., “Characterization of the Epitope for Anti-Human Respiratory Syncytial Virus F Protein Monoclonal Antibody 101F Using Synthetic Peptides and Genetic Approaches,” *Journal of General Virology* 88, no. Pt 10 (2007): 2719–2723, <https://doi.org/10.1099/vir.0.82753-0>.
40. J. L. Sebaugh, “Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation,” *Pharmaceutical Statistics* 10, no. 2 (2011): 128–134.
41. INEC. *Superficie, Población y Densidad de Población en la República, Según Provincia, Comarca Indígena, Distrito y Corregimiento—Censos de 2000, 2010 y 2023*. (2023), <https://www.inec.gob.pa/archivos/P0705547520231109105354CUADRO%2010.pdf>.
42. M. W. Weber, M. W. Weber, E. K. Mulholland, E. K. Mulholland, and B. M. Greenwood, “Respiratory Syncytial Virus Infection in Tropical and Developing Countries,” *Tropical Medicine & International Health* 3, no. 4 (1998): 268–280.
43. D. Franco, C. Gonzalez, L. E. Abrego, et al., “Early Transmission Dynamics, Spread, and Genomic Characterization of SARS-CoV-2 in Panama,” *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid 27, no. 2 (2021): 612–615, <https://doi.org/10.3201/eid2702.203767>.
44. B. Abu-Raya, M. Viñeta Paramo, F. Reicherz, and P. M. Lavoie, “Why Has the Epidemiology of RSV Changed During the COVID-19 Pandemic?” in *eClinicalMedicine*, vol. 61 (Elsevier Ltd., 2023): 102089, <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.102089>.
45. S. Goya, S. T. Wendm, H. Xie, et al., “Genomic Epidemiology and Evolution of Rhinovirus in Western Washington State, 2021–2022,” *Journal of Infectious Diseases* 231 (2024): e154–e164, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae347>.
46. R. Agha and J. R. Avner, “Delayed Seasonal RSV Surge Observed During the COVID-19 Pandemic,” *Pediatrics* 148, no. 3 (2021): 1–3, <https://doi.org/10.1542/peds.2021-052089>.
47. M. Ujiie, S. Tsuzuki, T. Nakamoto, N. Iwamoto, and M. Ujiie, “Resurgence of Respiratory Syncytial Virus Infections During COVID-19 Pandemic, Tokyo, Japan,” *Emerging Infectious Diseases* 27, no. 11 (2021): 2969–2970, <https://doi.org/10.3201/eid2711.211565>.
48. Z. Zheng, V. E. Pitzer, J. L. Warren, and D. M. Weinberger, “Community Factors Associated With Local Epidemic Timing of Respiratory Syncytial Virus: A Spatiotemporal Modeling Study,” *Science, Advances* 7, no. 26 (2021): eabd6421.
49. A. C. Langedijk, B. Vrancken, R. J. Lebbink, et al., “The Genomic Evolutionary Dynamics and Global Circulation Patterns of Respiratory Syncytial Virus,” *Nature Communications* 15, no. 1 (2024): 3083, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47118-6>.
50. J. A. Melero and M. L. Moore, “Influence of Respiratory Syncytial Virus Strain Differences on Pathogenesis and Immunity,” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 372 (2013): 59–82, https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_3.
51. J. Yu, C. Liu, Y. Xiao, et al., “Respiratory Syncytial Virus Seasonality, Beijing, China, 2007–2015,” *Emerging Infectious Diseases* 25, no. 6 (2019): 1127–1135, <https://doi.org/10.3201/eid2506.180532>.
52. S. Goya, J. Sereewit, D. Pfalmer, et al., “Genomic Characterization of Respiratory Syncytial Virus During 2022–23 Outbreak, Washington, USA,” *Emerging Infectious Diseases* 29, no. 4 (2023): 865–868.
53. N. Korsun, I. Trifonova, I. Madzharova, et al., “Resurgence of Respiratory Syncytial Virus With Dominance of RSV-B During the 2022–2023 Season,” *Frontiers in Microbiology* 15 (2024): 1–14, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1376389>.
54. A. Pierangeli, F. Midulla, A. Piralla, et al., “Sequence Analysis of Respiratory Syncytial Virus Cases Reveals a Novel Subgroup-B Strain Circulating in North-Central Italy After Pandemic Restrictions,” *Journal of Clinical Virology* 173 (2024): 105681, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2024.105681>.
55. A. Pierangeli, R. Nenna, M. Fracella, et al., “Genetic Diversity and Its Impact on Disease Severity in Respiratory Syncytial Virus Subtype-A and -B Bronchiolitis Before and After Pandemic Restrictions in Rome,” *Journal of Infection* 87, no. 4 (2023): 305–314, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.07.008>.
56. M. Redlberger-Fritz, D. N. Springer, S. W. Aberle, J. V. Camp, and J. H. Aberle, “Respiratory Syncytial Virus Surge in 2022 Caused by Lineages Already Present Before the COVID-19 Pandemic,” *Journal of Medical Virology* 95, no. 6 (2023): e28830, <https://doi.org/10.1002/jmv.28830>.
57. M. Iglesias-Caballero, S. Camarero-Serrano, S. Varona, et al., “Genomic Characterisation of Respiratory Syncytial Virus: A Novel System for Whole Genome Sequencing and Full-Length G and F Gene Sequences,” *Eurosurveillance* 28, no. 48 (2023): 1–6, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.49.2300637>.

58. F. Tramuto, C. M. Maida, G. Randazzo, et al., "Whole-Genome Sequencing and Genetic Diversity of Human Respiratory Syncytial Virus in Patients With Influenza-Like Illness in Sicily (Italy) From 2017 to 2023," *Viruses* 16, no. 6 (2024): 1–20, <https://doi.org/10.3390/v16060851>.
59. M. Yunker, A. Fall, J. M. Norton, et al., "Genomic Evolution and Surveillance of Respiratory Syncytial Virus During the 2023–2024 Season," *Viruses* 16, no. 7 (2024): 1122, <https://doi.org/10.3390/v16071122>.
60. V. Boccard, B. Prevost, S. Denamur, E. Peulier-Maitre, N. Nathan, and H. Corvol, "Bronchiolitis: Increased Severity in the Post-COVID-19 era," *Pediatric Pulmonology* 59, no. 12 (2024): 3197–3203, <https://doi.org/10.1002/ppul.27172>.
61. D. Wilkins, A. C. Langedijk, R. J. Lebbink, et al., "Nirsevimab Binding-Site Conservation in Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Worldwide Between 1956 and 2021: An Analysis of Observational Study Sequencing Data," *Lancet Infectious Diseases* 23, no. 7 (2023): 856–866, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00062-2).
62. B. Ahani, K. M. Tuffy, A. A. Aksyuk, et al., "Molecular and Phenotypic Characteristics of RSV Infections in Infants During two Nirsevimab Randomized Clinical Trials. *Nature*," *Communications* 14, no. 1 (2023): 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40057-8>.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section. **Table S1:** RSV genomes obtained, distributed by epidemic outbreak (2018 to 2024), antigenic subgroup, and demographic characteristics of patients in Panama. **Table S2:** Clinical and demographic characteristics of RSV-positive cases (2018–2024) sequenced by WGS and grouped by epidemic outbreak and lineage found. **Table S3:** Statistical Association Between RSV Lineages and Demographic Characteristics Using Chi-Square Test of Independence. **Table S4:** RSV lineages involved in the 2018–2024 epidemic outbreaks based on the clinical and demographic characteristics of the patients. **Table S5:** Information about the RSV strains isolated and those selected for the neutralization assay with mAbs. **Figure S1:** Maximum likelihood phylogenetic trees of Fusion gen of RSV-A and RSV-B grouped with reference strains. RSV genomes from Panama are highlighted with circles ranging from light red (2018) to dark red (2024) at branch tips. RSV subgroups are represented by the colors of the tree branches. The isolated strains subjected to neutralization assays (NT) against the F protein are indicated in the tree. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. RSV-A, RSV subgroup A; RSV-B, RSV subgroup B; NT, neutralization test. **Figure S2:** Determination of IC50 values for RSV isolates. Each graph corresponds to a specific strain, indicated at the top of each plot. Neutralization assays were performed using monoclonal antibodies (mAbs), with their respective concentrations (ng/mL) shown on the x-axis. The y-axis represents the number of FFU counted in each well. mAbs are color coded as follows: MEDI8897* (turquoise), AM14 (magenta), motavizumab (blue), and MF 14 (green). IC50 values were calculated by fitting the experimental data to a four-parameter logistic (4PL) equation using Microsoft Excel (Sebaugh, 2011). hRSV, human respiratory syncytial virus; FFU, focus-forming units; mAbs, monoclonal antibodies; ng, nanograms; mL, milliliters.

NOTA: EL MATERIAL SUPLEMENTARIO DE ESTE ARTÍCULO CIENTÍFICO SE INCLUYE EN LOS ANEXOS DE ESTA TESIS.

DISCUSIÓN (Periodo 2018–2024)

Este estudio proporciona una visión detallada de las características genotípicas y fenotípicas del VSRh en Panamá durante los últimos años, evidenciando la alternancia en la predominancia de los subgrupos VSRh-A y VSRh-B, la emergencia y co-circulación de diversos linajes, así como una alta sensibilidad de las cepas circulantes frente a anticuerpos monoclonales, incluyendo MEDI8897* (Nirsevimab parental). Los patrones observados reflejan la epidemiología del VSRh en un país con alta conectividad internacional, lo que puede influir en la introducción y diseminación viral .

Entre 2018 y 2024, se registraron brotes epidémicos anuales asociados a la temporada lluviosa, en concordancia con lo descrito para climas tropicales (Weber et al., 1998). Las medidas implementadas durante la pandemia de COVID-19 alteraron la circulación de virus respiratorios, incluyendo el VSRh, que resurgió en 2021 con detecciones a lo largo del año (Abu-Raya et al., 2023; Agha & Avner, 2021; Franco et al., 2021). Este comportamiento resalta la influencia de los cambios en la dinámica social sobre la epidemiología viral. Asimismo, la mayor diversidad observada en el área metropolitana sugiere un vínculo entre densidad poblacional, movilidad y múltiples introducciones virales, en línea con reportes globales (Langedijk et al., 2024; Zheng et al., 2021).

Se identificó un patrón de alternancia entre subgrupos VSRh-A y VSRh-B, fenómeno previamente descrito y asociado a cambios en la inmunidad poblacional y deriva antigénica (Goya, Lucion, et al., 2023; Yu et al., 2019). En Panamá, VSRh-B predominó en 2021, posiblemente relacionado con la introducción del linaje B.D.E.1 y la disminución de la exposición viral durante la pandemia, mientras que VSRh-A predominó en 2022,

probablemente favorecido por la inmunidad generada frente a VSRh-B (Goya, Sereewit, et al., 2023; Korsun et al., 2024). No obstante, estos patrones pueden variar entre regiones (Pierangeli et al., 2023; Redlberger-Fritz et al., 2023; Tabor et al., 2020).

Los linajes identificados en Panamá son consistentes con los descritos globalmente, con predominio post-pandemia de A.D.1 y A.D.5.2 en VSRh-A, y B.D.4.1.1 y B.D.E.1 en VSRh-B (Iglesias-Caballero et al., 2023; Rice et al., 2025; Tramuto et al., 2024; Yunker et al., 2024). Además, se observó una mayor diversidad genética en VSRh-A en comparación con VSRh-B, reflejada en un mayor número de linajes co-circulantes (Langedijk et al., 2024). Se identificó también una posible asociación entre el linaje B.D.4.1.1 y mayor severidad clínica, incluyendo hospitalizaciones y un caso fatal, aunque esta relación requiere mayor investigación (Boccard et al., 2024; Pierangeli et al., 2023).

En cuanto a la sensibilidad a anticuerpos monoclonales, todas las cepas evaluadas mostraron alta susceptibilidad a MEDI8897*, motavizumab y AM14, con valores de IC50 comparables a estudios previos (Zhu et al., 2017). A pesar de la presencia de múltiples sustituciones en la proteína F, los principales sitios antigénicos se mantuvieron conservados, en concordancia con estudios que destacan la estabilidad de estos epítomos a lo largo del tiempo (Wilkins et al., 2023). Algunas mutaciones, como I206M y Q209R en VSRh-B, incluso incrementaron la afinidad por nirsevimab, potenciando su capacidad neutralizante (Ahani et al., 2023). Estos hallazgos sugieren que la eficacia de anticuerpos monoclonales es independiente de la posible severidad asociada a ciertos linajes y respaldan su potencial uso en estrategias de prevención.

Finalmente, la combinación de vigilancia genómica y evaluación funcional será clave para anticipar la eficacia de futuras intervenciones, incluyendo vacunas y terapias con anticuerpos monoclonales. En este contexto, la generación y publicación de estos resultados constituye un aporte relevante para Panamá, al proporcionar evidencia previa a la implementación de estrategias preventivas, facilitando la toma de decisiones en salud pública y el monitoreo del impacto de estas intervenciones en la dinámica evolutiva del VSRh.

2.3 Panorama integrador de la dinámica evolutiva del VSRh en Panamá (2006–2024)

Como se ha evidenciado a lo largo de los distintos periodos analizados, el VSRh en Panamá ha generado brotes epidémicos recurrentes caracterizados por una dinámica de circulación compleja. Este análisis integró 311 genomas completos, distribuidos en 111 correspondientes al periodo 2006–2017 y 200 al periodo 2018–2024, de los cuales 223 pertenecen al subgrupo A y 88 al subgrupo B, reflejando la participación de ambos subgrupos antigénicos y múltiples linajes virales en la dinámica de circulación observada en el país. A lo largo de las temporadas epidémicas se ha observado una alternancia en la predominancia de los subgrupos (Figura 19), así como la co-circulación de diferentes linajes, con variaciones en su frecuencia y duración en el tiempo (Figura 20 y 21). Algunos linajes muestran una mayor capacidad de diseminación y permanencia, mientras que otros presentan una circulación más limitada o restringida a periodos específicos. Estos patrones reflejan una dinámica evolutiva activa, asociada a la generación de diversidad genética y a cambios en la composición de las poblaciones virales que circulan en el país. Panamá no contaba con herramientas sistemáticas que permitieran diferenciar los subgrupos y linajes circulantes en cada brote epidémico, como ensayos moleculares específicos tipo RT-PCR dirigidos a subgrupos, lo que limitaba la

caracterización detallada de la circulación viral. En este contexto, los resultados presentados constituyen uno de los primeros esfuerzos integrales basados en genomas completos para reconstruir la dinámica de circulación del VSRh en el país, permitiendo identificar retrospectivamente la participación de subgrupos y linajes en los distintos eventos epidémicos.

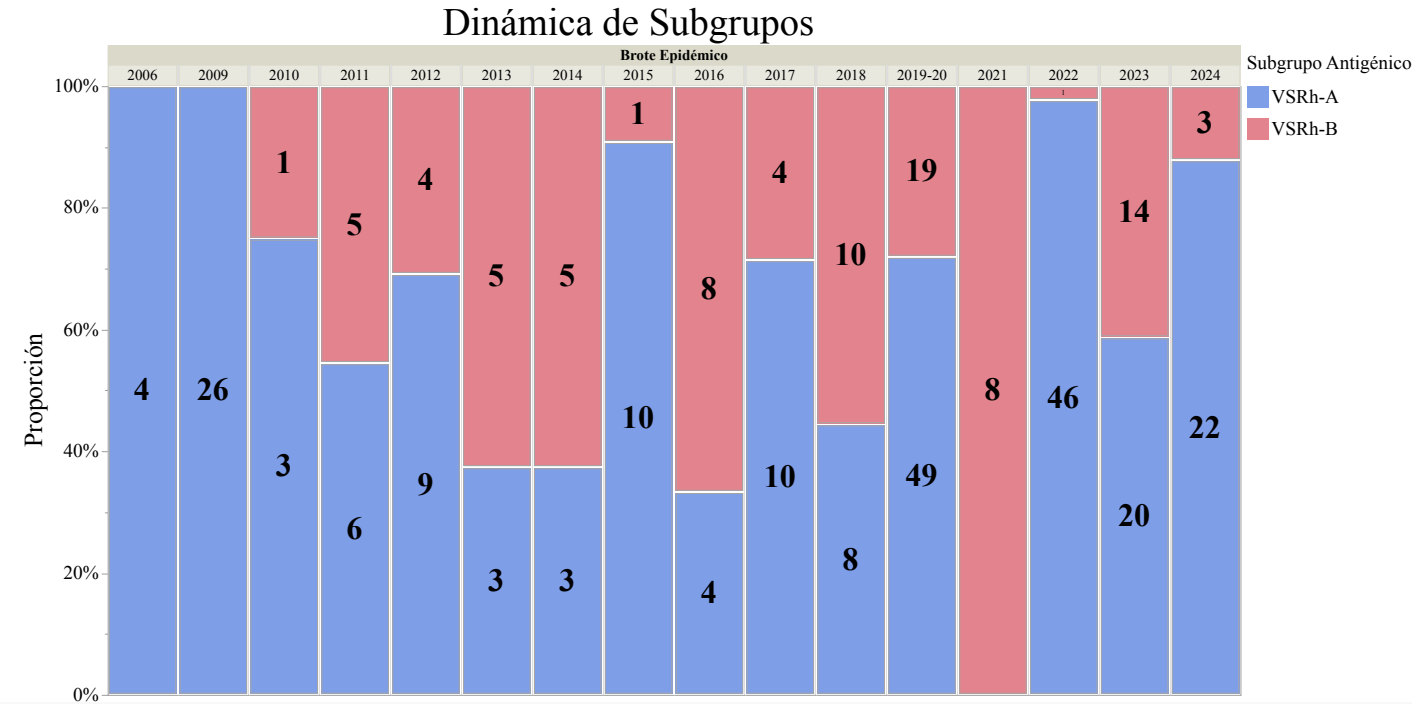


Figura 19. Dinámica de subgrupos antígenicos del VSRh en Panamá durante los brotes epidémicos (2006–2024). Proporción anual de los subgrupos VSRh-A (azul) y VSRh-B (rojo) en cada temporada epidémica, basada en 311 genomas obtenidos (223 VSRh-A y 88 VSRh-B). Los valores numéricos dentro de cada barra indican el número de genomas analizados por subgrupo en cada año. Se observa una alternancia en la predominancia de los subgrupos a lo largo del periodo de estudio, así como años de co-circulación con proporciones variables entre ambos.

VSRh-A

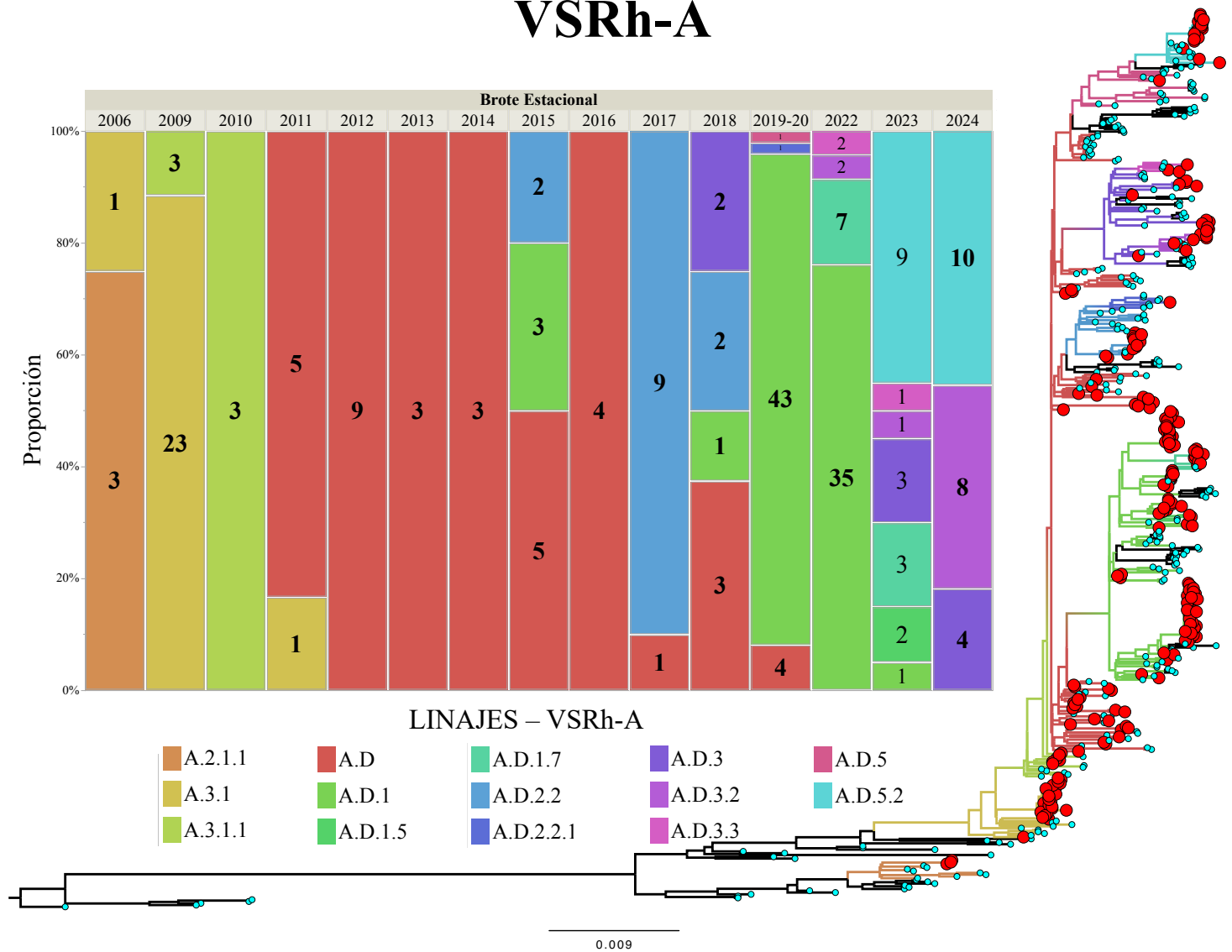


Figura 20. Proporción anual de los diferentes linajes de VSRh-A identificados a partir del análisis filogenómico de genomas completos. Cada color representa un linaje específico, mientras que los valores numéricos dentro de las barras indican el número de genomas asignados a cada linaje por año. A la derecha se muestra un árbol filogenético de máxima verosimilitud, donde las puntas terminales (tips) en rojo representan las secuencias obtenidas en este estudio (cepas panameñas), mientras que las puntas en color celeste corresponden a secuencias de referencia. El color de las ramas del árbol es consistente con la clasificación por linaje; las ramas en negro corresponden a linajes no identificados en este estudio o a otros linajes no representados en el conjunto analizado.

VSRh-B

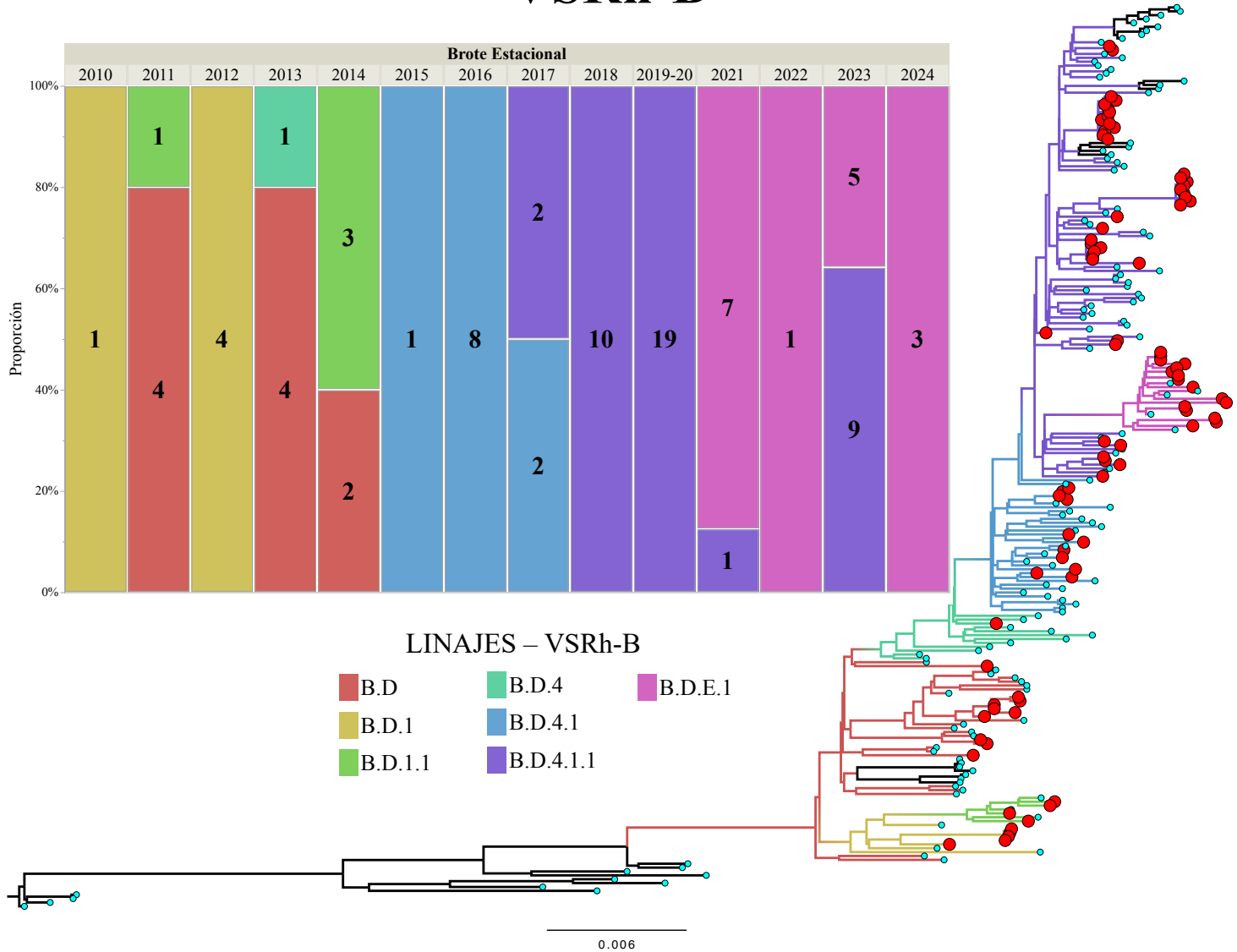


Figura 21. Dinámica de linajes del VSRh-B en Panamá durante los brotes epidémicos (2010–2024). Proporción anual de los diferentes linajes de VSRh-B identificados a partir del análisis filogenómico de genomas completos. Cada color representa un linaje específico, mientras que los valores numéricos dentro de las barras indican el número de genomas asignados a cada linaje por año. A la derecha se muestra un árbol filogenético de máxima verosimilitud, donde las puntas terminales (tips) en rojo representan las secuencias obtenidas en este estudio (cepas panameñas), mientras que las puntas en color celeste corresponden a secuencias de referencia. El color de las ramas del árbol es consistente con la clasificación por linaje; las ramas en negro corresponden a linajes no identificados en este estudio o a otros linajes no representados en el conjunto analizado.

Durante el periodo 2006–2024 se identificaron más de diez linajes distintos de VSRh-A (Figura 20), lo que evidencia una alta diversidad genética y una dinámica de reemplazo sostenida en el tiempo. En los primeros años del estudio (2006–2010), la circulación estuvo dominada por linajes previos a la aparición de duplicaciones en la región G, incluyendo A.2.1.1, A.3.1 y A.3.1.1. A partir de 2011, se observa la emergencia y rápida expansión del linaje A.D, caracterizado por la presencia de una duplicación de 72 nucleótidos en el gen G, el cual desplazó progresivamente a los linajes previamente circulantes y pasó a dominar las temporadas epidémicas subsiguientes. Este linaje experimentó posteriormente una diversificación progresiva, dando lugar a múltiples sublinajes, entre ellos A.D.1, A.D.3, A.D.2.2 y A.D.5. En 2017 se evidenció el predominio del sublinaje A.D.2.2, seguido de un periodo comprendido entre 2019 y 2022 caracterizado por la mayor frecuencia y predominio del A.D.1. En años más recientes, la circulación ha estado dominada por linajes emergentes como A.D.5.2 y A.D.3.2, lo que sugiere un nuevo recambio en la composición genética de la población viral. Asimismo, en varias temporadas se observó la co-circulación de múltiples linajes, alcanzando hasta siete linajes distintos en 2023, aunque con diferencias marcadas en su frecuencia relativa. Estos resultados evidencian un patrón dinámico de reemplazo y diversificación de linajes, en el que variantes emergentes sustituyen progresivamente a linajes previamente dominantes, configurando la estructura genética del VSRh-A en Panamá a lo largo de casi dos décadas.

En cuanto a VSRh-B, durante el periodo 2010-2024 se identificaron múltiples linajes (Figura 21), evidenciando una dinámica de circulación caracterizada por eventos de reemplazo y cambios en la composición genética a lo largo del tiempo. En los primeros años (2010–2013), la circulación estuvo dominada por linajes como B.D y B.D.1, con una participación variable de otros linajes minoritarios. Posteriormente, se observa una transición en la dinámica de

circulación, destacando el predominio del sublinaje B.D.4.1 durante 2015 y 2016. A partir de 2017, emerge el sublinaje B.D.4.1.1, el cual se expande y domina la circulación durante los años siguientes. En años más recientes (2020–2024), se observa la emergencia y predominancia del linaje B.D.E.1, el cual desplazó progresivamente a los linajes previamente circulantes, consolidándose como el principal linaje en las últimas temporadas epidémicas. A diferencia de lo observado para VSRh-A, la co-circulación de linajes en VSRh-B fue más limitada, registrándose como máximo la presencia simultánea de dos linajes por año, lo que indica una menor diversidad y una estructura poblacional más homogénea a lo largo del tiempo.

CONCLUSIONES

El análisis longitudinal del VSRh en Panamá, abarcando el período 2006–2024, evidencia una dinámica evolutiva caracterizada por la introducción recurrente de variantes, la co-circulación de múltiples linajes y el reemplazo progresivo de estos a lo largo del tiempo, en concordancia con los patrones descritos a nivel regional y global. La alternancia entre subgrupos virales, junto con una mayor diversidad genética observada en VSRh-A en comparación con VSRh-B, refuerza la naturaleza altamente dinámica de la circulación viral en un contexto tropical.

A pesar de esta diversidad genómica, la proteína de Fusión (F) mostró una notable conservación estructural y antigénica a lo largo de todo el período estudiado. Las mutaciones identificadas en regiones relevantes no se asociaron con fenotipos de escape frente a anticuerpos monoclonales, lo cual fue consistentemente respaldado por ensayos de neutralización que demostraron una alta sensibilidad de los aislamientos panameños frente a todos los anticuerpos evaluados, incluyendo el anticuerpo parental de nirsevimab. Asimismo, análisis funcionales específicos confirmaron que variaciones como A122T en el péptido p27 no afectan el procesamiento proteolítico de la proteína F.

El período posterior a 2020 evidenció el impacto significativo de la pandemia de COVID-19 sobre la epidemiología del VSRh, reflejado en la interrupción de la circulación viral, la alteración de la estacionalidad y la posterior reemergencia con patrones atípicos, acompañados de la introducción y reemplazo de nuevos linajes. Estos hallazgos resaltan la sensibilidad de la dinámica del VSRh a cambios en el comportamiento poblacional y en las

medidas de salud pública. Los resultados indican que, previo a la implementación generalizada de nuevas estrategias de prevención, como vacunas maternas y anticuerpos monoclonales de acción prolongada, el VSRh en Panamá presenta una elevada diversidad genética pero mantiene una alta conservación antigénica en la proteína F, sin evidencia de variantes con escape inmunológico. Este escenario sugiere un contexto favorable para la efectividad de las intervenciones actualmente disponibles.

No obstante, considerando la capacidad evolutiva del virus y la presión selectiva que podrían ejercer estas nuevas herramientas, se hace indispensable mantener una vigilancia genómica continua y el monitoreo funcional de variantes emergentes. Este estudio establece una línea base robusta sobre la evolución y antigenicidad del VSRh en Panamá, que será fundamental para evaluar el impacto futuro de las intervenciones y detectar oportunamente posibles cambios con implicaciones clínicas y epidemiológicas.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

PANORAMA GENÓMICO, DIVERSIDAD, PATRONES DE REEMPLAZO Y VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ A LO LARGO DE 20 AÑOS

Metapneumovirus humano (MPVh) es un virus de ARN de cadena negativa no segmentado, perteneciente a la familia *Pneumoviridae*, con un genoma de aproximadamente 13.3 kb que codifica nueve proteínas. Entre ellas destaca la proteína G, altamente variable y asociada con la evasión del sistema inmunológico (Bao, Liu, et al., 2008). Filogenéticamente, el virus se clasifica en dos grupos antigénicos, A y B, con subdivisiones A1, A2, B1 y B2 (Van den Hoogen et al., 2004). El linaje A2 ha evolucionado en las variantes A2.1 y A2.2, esta última subdividida en A2.2.1 y A2.2.2 (Groen et al., 2023). Dentro de este grupo se han identificado cepas con duplicaciones de 111nt (111dup) o 180nt (180dup) en el gen G, actualmente predominantes a nivel mundial (Groen et al., 2023; Piñana et al., 2017, 2023; Saikusa et al., 2017)

En Panamá, entre 2010 y 2012, el análisis del gen de la nucleocápside evidenció la circulación simultánea de los sublinajes A2a, A2b, B1 y B2, con un claro predominio de A2b (55.5%), lo que reflejó una considerable diversidad genética en la región (Ábrego et al., 2018). Actualmente, la emergencia de la variante A2.2.2-111dup ha motivado su monitoreo mediante secuenciación del genoma completo, dado que presenta una tasa evolutiva ligeramente superior a la de otros sublinajes (Goya et al., 2025; Piñana et al., 2023), lo que podría asociarse con mayor severidad clínica y mecanismos de evasión inmune.

Este estudio ofrece un análisis de genomas completos de MPVh obtenidos de muestras respiratorias positivas recolectadas entre 2006 y 2025 en Panamá, aportando evidencia clave desde una región donde los estudios genómicos sobre este virus han sido nulos o limitados. Además, incluye una caracterización detallada de las variaciones genéticas de la proteína F, uno de los principales determinantes antigénicos y funcionales del virus, lo que permite evaluar su estabilidad evolutiva, identificar sustituciones relevantes y contextualizar su impacto potencial frente a anticuerpos neutralizantes y estrategias profilácticas en desarrollo.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Declaración de Ética

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas (219/CBI/ICGES/22). Al tratarse de muestras de vigilancia epidemiológica y sin comprometer datos personales, no se requirió consentimiento ni asentimiento informado.

1.2 Población de estudio

En Panamá, la vigilancia de virus respiratorios se remonta a 1976 (Quiroz R et al., 1987). Tras la adopción del Reglamento Sanitario Internacional (2005), el país consolidó en 2006 su red centinela nacional, integrada al Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud. Esta red recolecta semanalmente muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes con enfermedad tipo influenza (ETI) e infecciones respiratorias agudas graves (IRAG), que son enviadas a laboratorios designados o al Centro Nacional de Influenza (NIC) para su análisis (MINSA, 2017). En agosto de 2010, se incorporó la detección molecular de MPVh, permitiendo su monitoreo sistemático dentro del componente virológico nacional.

1.3 Muestras clínicas, extracción de ARN viral y RT-qPCR

Las muestras de HNF fueron manejadas según el año de recolección. Muestras recolectadas entre 2006 y 2009, al no contar con diagnóstico previo para MPVh, fueron agrupadas en pooles (mezclas de 3 a 5 muestras) con el fin de realizar una detección inicial del virus (Kodani et al., 2011); aquellos pooles que resultaron positivos fueron luego desagregados para identificar la(s) muestra(s) individual(es) positiva(s). En contraste, las muestras obtenidas entre el 1 de agosto de 2010 y el 30 de junio de 2025 fueron analizadas por RT-qPCR al momento de su recolección como parte de la vigilancia rutinaria, siguiendo los protocolos del CDC para virus respiratorios (Kodani et al., 2011; Shu et al., 2021). De las muestras positivas para MPVh de 2006 a 2025 se seleccionaron aleatoriamente 408 especímenes (Tabla IX), y se extrajo ARN con el sistema KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). De estas, 202 con Ct <28 fueron utilizadas para la secuenciación del genoma completo (Tabla X).

Tabla IX. Características de las muestras MPVh-positivas seleccionadas para el análisis (2006–2025)

Características	Brotos Estacionales														
	2006 a 2009	2010	2011-12	2012	2013	2014-15	2015	2016	2017	2018-19	2019-20	2022	2023	2024-25	Total (%)
Muestras Positivas	18	27	9	18	19	13	14	13	29	62	73	52	33	28	408 (100)
Género															
Masculino	7	17	5	10	9	11	7	8	17	32	54	31	20	18	246 (60.3)
Femenino	4	9	4	8	10	2	7	5	12	30	19	21	13	10	154 (37.7)
S/D	7	1													8 (2.0)
Estado Clínico															
Hospitalizado	2	24	6	13	15	12	12	11	25	53	67	17	14	23	294 (72.1)
Ambulatorio	6	2	3	5	4	1	2	2	4	9	6	35	18	5	102 (25.0)
Fallecido													1		1 (0.2)
S/D	10	1													11 (2.7)
Edad de paciente, años															
< 1	3	17	4	8	10	11	9	6	17	37	42	12	12	7	195 (47.8)
1 - 4	2	6	4	7	5	1	3	6	9	25	29	22	10	19	148 (36.3)
5 - 49	6	2		3	4	1	2	1	2		2	15	10	1	49 (12.0)
≥50		1	1						1			3	1	1	8 (2.0)
S/D	7	1													8 (2.0)
Área Geográfica															
AM&P	8	13	7	7	12	10	11	6	10	40	25	45	22	22	238 (58.3)
Resto del País	2	13	2	11	7	3	3	7	19	22	48	7	11	6	161 (39.5)
S/D	8	1													9 (2.2)

"MPVh": Metapneumovirus humano; "S/D": sin datos disponibles; AM&P: área metropolitana y periferia.

Las muestras positivas fueron seleccionadas según su disponibilidad dentro del sistema nacional de vigilancia y almacenadas en el Centro Nacional de Influenza (NIC). Se agruparon por brote epidémico y por características clínicas y demográficas, y se reevaluaron mediante RT-PCR para confirmar la integridad del ARN. Entre 2006 y 2009, el sistema de vigilancia no incluía pruebas para MPVh, por lo que no se cuenta con información epidemiológica de posibles brotes en ese período.

Tabla X. Características de las 202 muestras MPVh-positivas 202 con Ct <28 fueron utilizadas para la secuenciación del genoma completo (2006–2025)

Características	Brotos Estacionales															Total (%)
	2006 a 2009	2010	2011-12	2012	2013	2014-15	2015	2016	2017	2018-19	2019-20	2022	2023	2024-25		
Muestras Positivas	14	12	4	7	8	7	7	10	14	16	24	22	30	27	202 (100)	
Género																
Masculino	6	7	1	3	4	6	4	6	8	9	18	10	17	18	117 (57.9)	
Femenino	3	5	3	4	4	1	3	4	6	7	6	12	13	9	80 (39.6)	
S/D	5														5 (2.5)	
Estado Clínico																
Hospitalizado	2	10	3	6	5	7	6	9	11	13	21	8	12	23	136 (67.3)	
Ambulatorio	4	2	1	1	3		1	1	3	3	3	14	17	4	57 (28.2)	
Fallecido													1		1 (0.5)	
S/D	8														8 (4.0)	
Edad de paciente, años																
< 1	3	6	2	3	4	7	6	4	8	7	17	6	11	7	91 (45.0)	
1 - 4	2	4	2	4	2			5	3	9	6	7	10	18	72 (35.6)	
5 - 49	4	1			2		1	1	2		1	7	8	1	28 (13.9)	
≥50		1							1			2	1	1	6 (3.0)	
S/D	5														5 (2.5)	
Área Geográfica																
AM&P	6	6	2	2	4	5	5	4	6	9	8	21	22	22	122 (60.4)	
Resto del País	2	6	2	5	4	2	2	6	8	7	16	1	8	5	74 (36.6)	
S/D	6														6 (3.0)	

"MPVh": Metapneumovirus humano; "S/D": sin datos disponibles; AM&P: área metropolitana y periferia.

La tabla resume el subconjunto de muestras incluidas en la Tabla IX que cumplieran con criterios óptimos de calidad ($Ct < 28$) para la secuenciación. Se presentan las distribuciones por género, estado clínico, grupos etarios y procedencia geográfica según cada brote estacional. Estas muestras fueron empleadas para la obtención y el análisis de los genomas completos de MPVh en este estudio.

1.4 Secuenciación del Genoma Completo (WGS)

La WGS se realizó según lo descrito previamente (Pollett et al., 2018). En resumen, se generó ADNc utilizando el sistema de síntesis SuperScript IV first-strand (SSIV, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) con cuatro cebadores directos para MPVh. Se realizaron cuatro reacciones de PCR independientes utilizando el kit Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.), generando cuatro amplicones superpuestos de aproximadamente 4 kb cada uno, cubriendo el genoma completo del MPVh. Los amplicones se verificaron en un gel de agarosa al 1%, se agruparon y se utilizaron para preparar las bibliotecas mediante el kit Nextera XT (Illumina, EE. UU., cat. FC-131-1096). Las bibliotecas fueron secuenciadas en un equipo Illumina MiSeq V2 utilizando una corrida de lectura pareada 2×250 .

1.5 Análisis de secuenciación de nueva generación

Los datos crudos en formato FASTQ pareados (Illumina; R1/R2) correspondientes a MPVh se procesaron mediante la pipeline `gencomvariable` v2.0 (<https://github.com/AAMCgenomics/gencomvariable.git>), ejecutada en un entorno Linux. Para cada muestra, las lecturas se sometieron a control de calidad y filtrado utilizando `Fastp`, conservando lecturas con puntaje de calidad promedio $\geq Q30$ y una longitud mínima de 200 pb. El filtrado generó archivos FASTQ depurados comprimidos (.fastq.gz) y reportes de calidad por muestra en formato HTML y JSON.

Posteriormente, los FASTQ filtrados se mapearon contra distintas secuencias de referencia de MPVh-A (GenBank: MZ851993, OL794469, OL794361, OL794460, KJ627385) o MPVh-B (GenBank: FJ168778.1, MZ504963, OL794453), seleccionadas en cada caso según el mejor rendimiento en términos de cobertura genómica y profundidad de lectura. El alineamiento de las lecturas pareadas se realizó mediante minimap2 (H. Li, 2018), generando archivos SAM por muestra, los cuales fueron posteriormente convertidos y ordenados en formato BAM. A partir de los archivos BAM se realizó el llamado de variantes en modo haploide, y las variantes identificadas se aplicaron sobre la secuencia de referencia correspondiente para reconstruir los genomas consenso finales en formato FASTA. Finalmente, se evaluaron métricas de profundidad y cobertura de secuenciación para verificar la calidad y uniformidad del ensamblaje.

1.6 Análisis filogenético

Se descargaron genomas completos de referencia de para cada linaje dentro de MPVh-A: A/NC_039199, A.2/FJ168779, A.2.1/AB503857, A.2.2.1/KC562220, A.2.2.1/KJ627417, A.2.2.2/OL794397, A.2.2.2-111dup/MK167040, A.2.2.2-180dup/OL794403; y dentro de MPVh-B: B.1/AY525843, B.1/KC403974, B.2/KC562232, B.2/AY297748. Las secuencias fueron agrupadas por subgrupos y alineadas utilizando MAFFT v7.490 (Katoh & Standley, 2013), y visualizadas con Aliview v1.28 (Larsson, 2014). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue determinado mediante ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), y los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud fueron inferidos utilizando IQ-TREE v2.2.0 (Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015). El soporte de ramas fue evaluado mediante 1,000

réplicas de bootstrap ultrarrápido (Nguyen et al., 2015). El árbol fue visualizado y anotado utilizando la herramienta iTOL (Interactive Tree of Life; <https://itol.embl.de/>)

1.7 Disponibilidad de datos de secuencias

Los genomas de MPVh de este estudio estarán disponibles en NCBI GenBank.

1.8 Análisis estadístico

La duración de los ciclos de predominancia de subgrupos se estimó mediante análisis de supervivencia utilizando el método de Kaplan–Meier (Bland & Altman, 1998), considerando como evento el reemplazo del linaje predominante. Se calcularon la media, mediana y rango de duración, así como la probabilidad acumulada de mantener la predominancia en el tiempo. Las asociaciones entre subgrupos o linajes y variables categóricas (género, estado clínico, grupo etario y área geográfica) se evaluaron mediante pruebas de independencia para datos categóricos, utilizando Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher según correspondiera. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

2. RESULTADOS

2.1 Patrón epidemiológico del MPVh en Panamá (2006–2025)

Entre 2006 y el 30 de junio de 2025, el metapneumovirus humano (MPVh) circuló en Panamá en brotes epidémicos recurrentes, con detección de casos que típicamente aumentaban durante la temporada lluviosa (Figura 22). En total, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica identificó 13 brotes estacionales entre 2010 y 2025, con 2,272 casos confirmados por

laboratorio de infección por MPVh en pacientes de todas las edades, equivalentes al 6.7% de los virus identificados en este periodo, excluyendo los casos de SARS-CoV-2 (Figura 22). Algunos de estos brotes se iniciaron en los últimos meses del año y se prolongaron hasta los primeros meses de la estación seca, por lo que fueron registrados con el nombre de dos años consecutivos.

Se obtuvo información genómica de 187 cepas de MPVh, de las cuales 185 correspondieron a genomas completos (98.9%). Respecto a las características demográficas, el 58.8% correspondió a varones, el 40.6% a mujeres y el 0.5% no se especificó. El estado clínico estuvo dominado por hospitalizados (67.9% vs. 29.4% ambulatorios), con un caso fatal (0.5%). La distribución por edad fue: <1 año (46.5%), 1–4 años (34.8%), 5–49 años (15.0%) y ≥50 años (3.2%) (Tabla XI). En cuanto a procedencia, el 61.5% de las muestras provinieron del Área Metropolitana y su Periferia (MA&P), que incluye los distritos de Panamá, San Miguelito, Arraiján y La Chorrera; el resto del país aportó el 37.4% (Tabla XI).

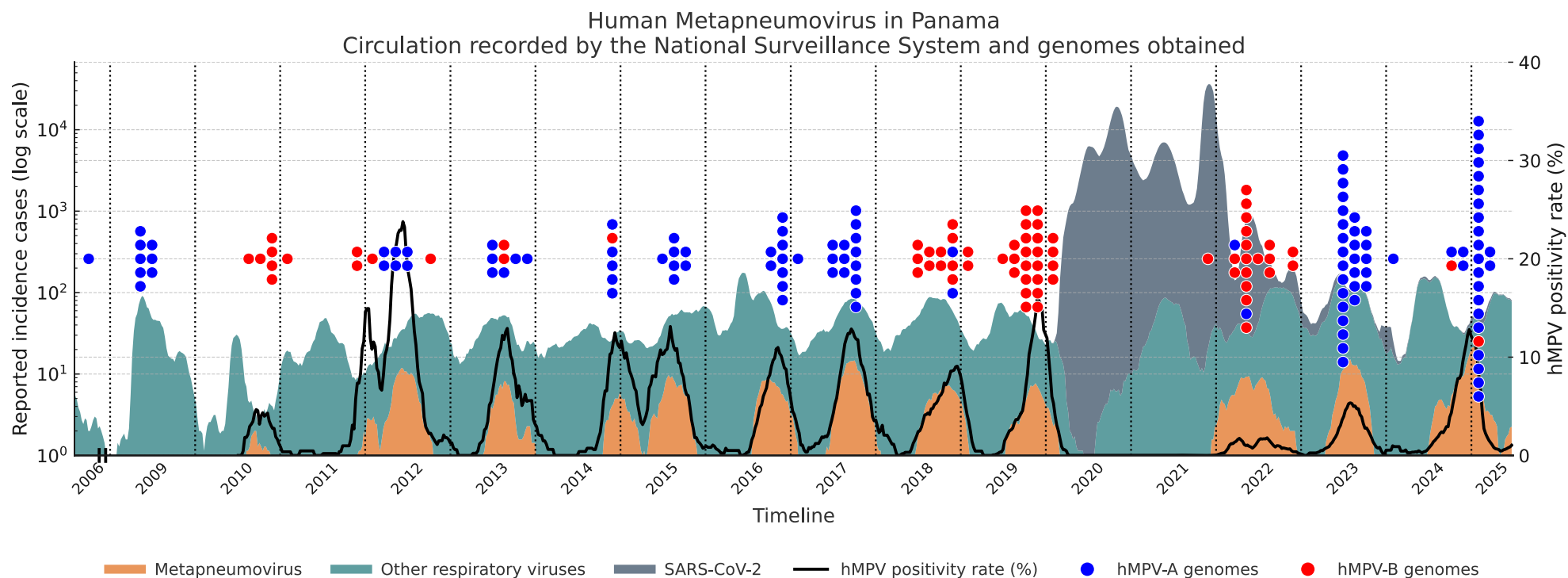


Figura 22. Dinámica estacional del MPVh en Panamá. Las áreas naranjas muestran los periodos de mayor circulación de MPVh, mientras que las zonas verdes y grises representan la actividad concomitante de otros virus respiratorios y SARS-CoV-2. La línea negra indica la variación de la tasa de positividad a lo largo del tiempo (muestras positivas por MPVh/total de muestras analizadas). Los puntos azules y rojos corresponden a los genomas recuperados de MPVh-A y MPVh-B, respectivamente.

Tabla XI: Genomas de MPVh obtenidos, distribuidos por período de circulación, grupo antigénico y características demográficas de los pacientes en Panamá

Características	Brote Estacional																				Total											
	2006 a 2009		2010		2011-12		2012		2013		2014-15		2015		2016		2017		2018-19					2019-20		2022		2023		2024-25		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	Total (%)			
No. de Genomas Completos	9		7		1	3		5	1	6	2	5	1	7		10		14		2	13	24		2	19	29		25	2	115	72	187 (100)
Género																																
Masculino	5		4		1		2	1	3	1	4	1	4		6		8		2	6	18		10	16		17	1	67	43	110 (58.8)		
Femenino	3		3	1	2		3		3	1	1		3		4		6			7	6	2	9	13		8	1	47	29	76 (40.6)		
S/D	1																												1	0	1 (0.5)	
Estado Clínico																																
Hospitalizado	1		5	1	2		5	1	5		5	1	6		9		11		2	10	21	1	7	11		21	2	78	49	127 (67.9)		
Ambulatorio	4		2		1				1	2			1		1		3			3	3	1	12	17		4		32	23	55 (29.4)		
Fallecido																								1				1	0	1 (0.5)		
S/D	4																												4	0	4 (2.1)	
Edad de paciente, años																																
< 1	3		3	1	1		3		4		5	1	6		4		8		1	6	17	1	5	11		7		54	33	87 (46.5)		
1 - 4	1		2		2	1	2		1	1				5		3		1	7	6	1	5	9		16	2	39	26	65 (34.8)			
5 - 49	4		1						1	1			1		1		2				1		7	8		1		18	10	28 (15.0)		
≥50			1														1					2	1			1		3	3	6 (3.2)		
S/D	1																												1	0	1 (0.5)	
Área Geográfica																																
AM&P	5		2	1	1		1	1	3	1	4	1	5		4		6		1	7	8	2	18	22		20	2	74	41	115 (61.5)		
Resto del País	2		5		2		4		3	1	1		2		6		8		1	6	16		1	7		5		39	31	70 (37.4)		
S/D	2																												2	0	2 (1.1)	

"MPVh", Metapneumovirus humano; "A", MPVh grupo A; "B", MPVh grupo B; "AM&P", Área metropolitana y periferia. Entre 2006 y 2025 se obtuvieron 187 genomas completos de MPVh, de los cuales el 61.5% correspondió al grupo MPVh-A y el 38.5% al grupo MPVh-B. La mayoría de los genomas provinieron de pacientes masculinos (58.8%), hospitalizados (67.9%) y de niños menores de 1 año (46.5%). Además, el 61.5% de los casos se registró en el área metropolitana y periferia.

2.2 Dinámica de Subgrupos y Linajes

Los datos de vigilancia y secuencias genómicas muestran circulación en la mayoría de los años, con alternancia en la predominancia de los subgrupos A y B (Figura 22). Entre 2006–2011 se observó circulación relativamente equilibrada, seguida de predominio de MPVh-A entre 2012–2017. Posteriormente, de 2018 a inicios de 2020, ocurrió un reemplazo con predominio de MPVh-B. Durante la pandemia de COVID-19 (2020–2021) no se documentó un brote estacional. En 2022 la actividad viral se intensificó con predominio de MPVh-B, seguido de un cambio hacia MPVh-A en 2023, que se mantuvo predominante en 2024 y 2025 (Figura 22).

El análisis de vigilancia indicó que los ciclos de predominancia tuvieron una duración media de 4 años (mediana: 4; rango: 2–6). El análisis de supervivencia mostró que la probabilidad de mantener la predominancia más allá de 5 años fue <30%, lo que sugiere que los reemplazos suelen ocurrir dentro de este intervalo (Figura 23).

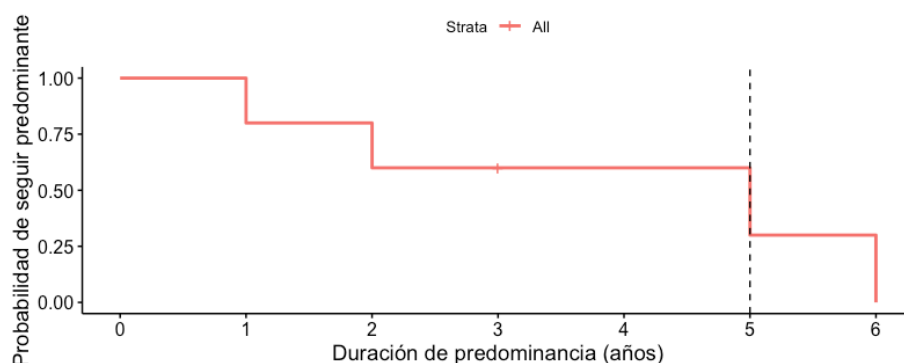


Figura 23. Curva de supervivencia de la duración de la predominancia de MPVh en Panamá, mostrando una probabilidad <30% de persistencia más allá de 5 años.

En el análisis por subgrupos, la distribución temporal de las 187 secuencias permitió identificar y caracterizar distintos linajes dentro de MPVh-A y MPVh-B (Figura 24 y 25), así

como documentar sus patrones de reemplazo a lo largo de los brotes epidémicos ocurridos entre 2006 y 2025 (Figura 26, Tabla XI). En el grupo A, los linajes más antiguos detectados en Panamá correspondieron a A2.1 y A2.2.1, con circulación continua entre 2006 y 2014. Aunque A2.1 dejó de registrarse después de 2012, se identificó un caso aislado en 2016, lo que sugiere una reintroducción puntual o una circulación de muy baja frecuencia que no había sido captada en los años previos. Estos linajes tempranos fueron posteriormente desplazados por variantes del clado A2.2.2, que dominaron la circulación en las temporadas subsiguientes. El linaje A.2.2.2 se detectó por primera vez en 2012 y también estuvo presente en el brote de 2014–2015. Posteriormente emergieron las variantes con inserciones en el gen G: A.2.2.2-180dup, identificada a partir de 2014 y con detección hasta 2023, y A.2.2.2-111dup, observada inicialmente en 2017 y que, tras 2022, se expandió y concentró la mayor proporción de casos en los brotes de 2023 y 2024–25. En concreto, los linajes del grupo A representaron el 61.5% de las secuencias, siendo A.2.2.2-111dup (29.4%) y A.2.2.2-180dup (18.2%) los más frecuentes, seguidos por A.2.2.1 (8.6%), A.2.1 (3.2%) y A.2.2.2 sin duplicación (2.1%) (Figura 26, Tabla XII).

En el grupo B, se identificaron los linajes B.1 y B.2, que en conjunto representaron el 38.5% de las secuencias. El linaje B.1 se detectó por primera vez en 2010 y predominó en los brotes de 2018–2019 y 2019–2020, con detecciones adicionales en 2022. El linaje B.2 se registró inicialmente en 2010, continuó presente en 2011–2013, resurgió en 2018–2020 y predominó en 2022, siendo responsable del primer brote de MPVh tras el levantamiento de las medidas de restricción por la pandemia de COVID-19. Además, en el brote más reciente (2024–25) se identificaron dos casos adicionales de este linaje. (Figura 26, Tabla XII).

MPVh-A

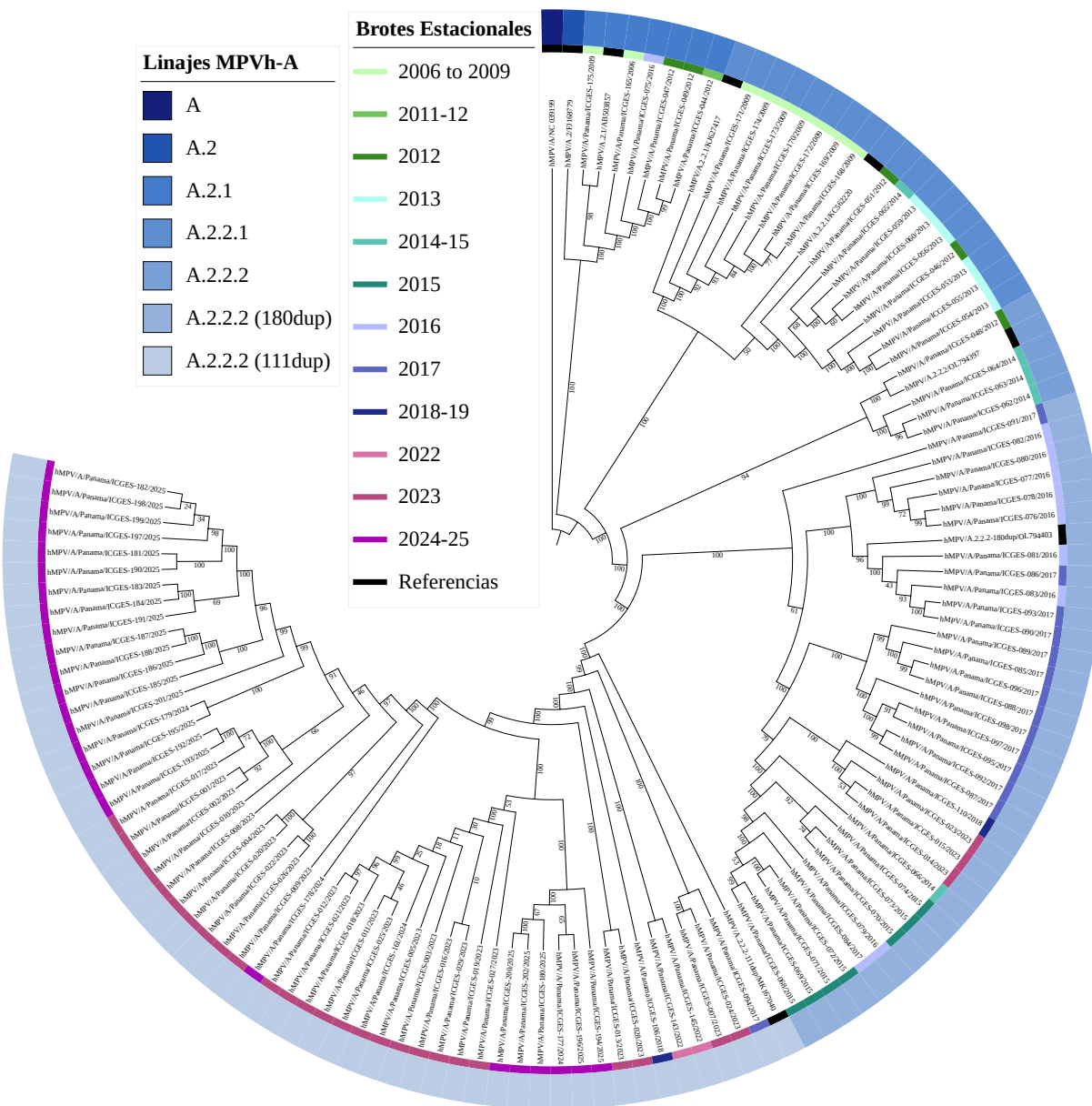


Figura 24. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud obtenidos a partir de genomas completos del grupo A, comparados con cepas de referencia. Los linajes del grupo A (A2.1, A2.2, A2.2.1, A2.2.2 y las variantes con duplicaciones de 180dup y 111dup) se representan en el anillo externo mediante distintos tonos de azul, evidenciando un marcado patrón de reemplazo sucesivo de linajes a lo largo del periodo. El anillo interno muestra los brotes estacionales asignados a cada secuencia, diferenciados por una escala cromática que permite visualizar la distribución temporal de la circulación viral y la aparición de nuevas variantes. Las cepas de referencia internacionales se incluyen para anclar la topología del árbol y confirmar la asignación filogenética de los genomas panameños. Los nodos con valores elevados de soporte (bootstrap) refuerzan la robustez de la agrupación interna y la estructura jerárquica observada entre linajes. La única muestra en este grupo que no alcanzó un genoma completo fue *hMPV/A/Panama/ICGES-165/2006*, con un 43.6% de recuperación de la secuencia. El árbol fue visualizado y anotado utilizando la herramienta iTOL (Interactive Tree of Life; <https://itol.embl.de/>)

MPVh-B

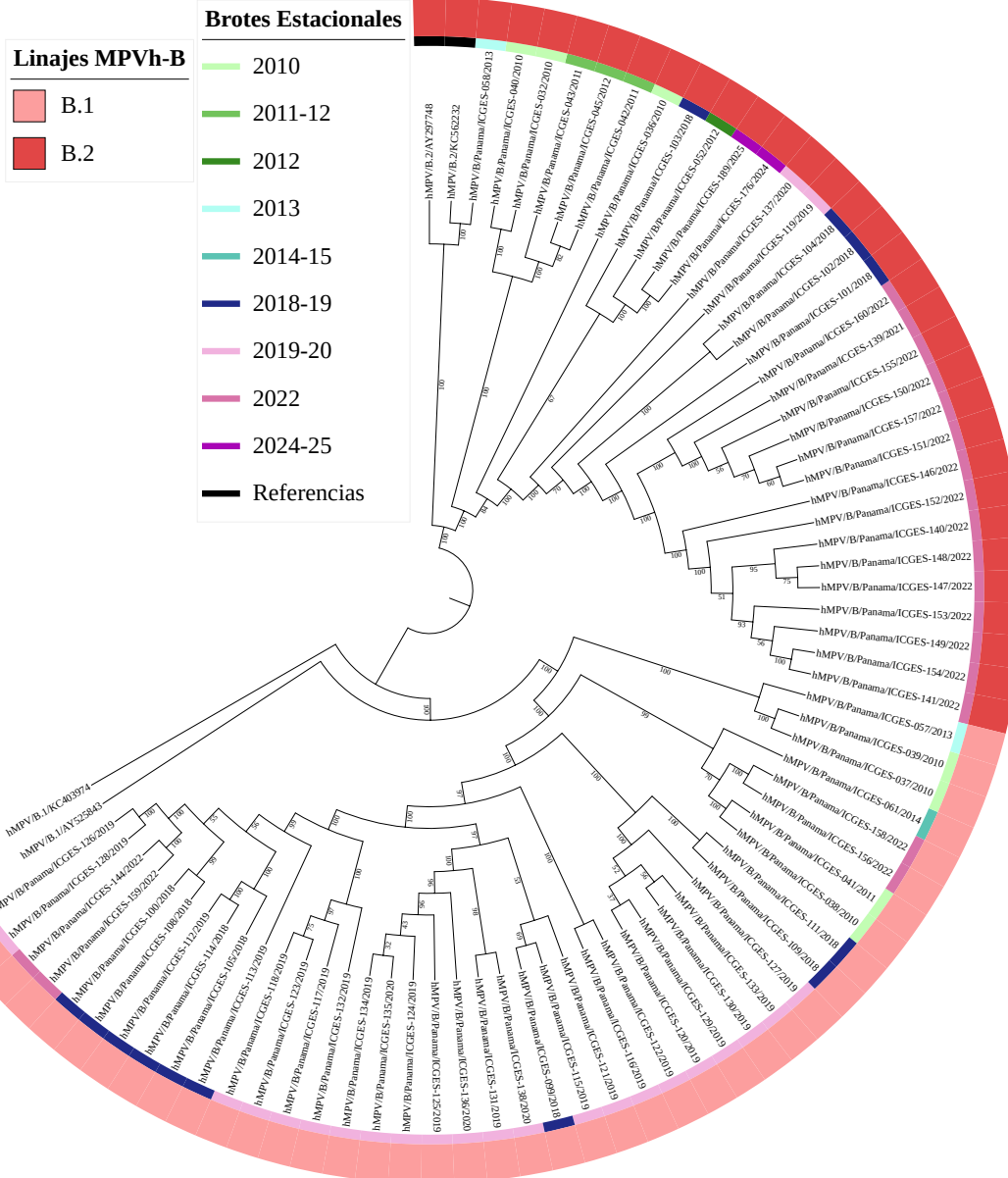


Figura 25. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud obtenidos a partir de genomas completos del grupo B, comparados con cepas de referencia. Los linajes B.1 y B.2 se representan en el anillo externo mediante tonalidades rosadas y rojas, lo que permite distinguir claramente la estructura bifurcada del grupo B y su distribución por linaje. El anillo interno muestra los brotes estacionales mediante una escala cromática, facilitando la visualización de los periodos de circulación de cada secuencia entre 2010 y 2025. En contraste con el grupo A, el grupo B exhibe un patrón marcado de alternancia entre linajes, con temporadas dominadas por B.1 seguidas por reemplazos temporales o resurgimientos de B.2, sin un desplazamiento sostenido de un linaje sobre el otro. Las cepas de referencia internacionales se incluyen para anclar la topología y validar la asignación filogenética de los genomas panameños, mientras que los valores altos de bootstrap en los nodos refuerzan la robustez de las agrupaciones internas. La única muestra en este grupo que no alcanzó un genoma completo fue *hMPV/B/Panama/ICGES-176/2024*, con un 92.6% de recuperación de la secuencia. El árbol fue visualizado y anotado utilizando la herramienta iTOL (Interactive Tree of Life; <https://itol.embl.de/>)

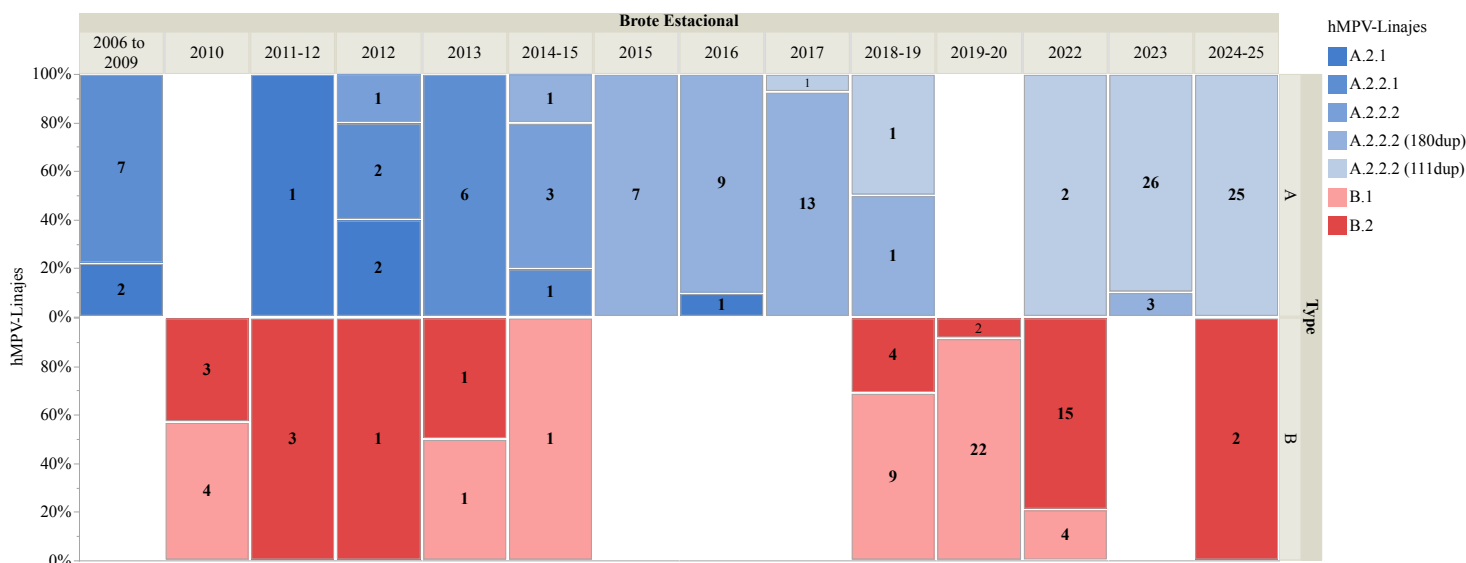


Figura 26. Distribución temporal de los linajes circulantes en Panamá, destacando el comportamiento diferencial entre ambos grupos: reemplazo dentro del grupo A y alternancia entre linajes del grupo B. Las barras coloreadas corresponden a los mismos códigos cromáticos utilizados en los árboles filogenéticos, donde los linajes del grupo A (A.2.1, A.2.2, A.2.2.1, A.2.2.2 y las variantes con duplicaciones de 180 nt y 111 nt) se representan en tonos de azul, mientras que los linajes del grupo B (B.1 y B.2) se muestran en tonos rosados y rojos. Cada bloque representa la proporción relativa de secuencias recuperadas en cada brote estacional entre 2006 y 2025. En el grupo A se observa un patrón de reemplazo sucesivo, con la progresiva transición desde A.2.1 hacia linajes del clado A.2.2 y, posteriormente, su dominio casi exclusivo por A.2.2.2 y sus variantes con duplicación en el gen G. En contraste, el grupo B exhibe un patrón de alternancia recurrente entre B.1 y B.2, con temporadas dominadas por uno u otro linaje sin evidencia de fijación sostenida.

Tabla XII. Distribución de los genomas completos de MPVh por linaje y brotes epidémicos (2006–2025)

Características	Brotes Estacionales														Total (%)
	2006 a 2009	2010	2011-12	2012	2013	2014-15	2015	2016	2017	2018-19	2019-20	2022	2023	2024-25	
No. de Genomas	9	7	4	6	8	6	7	10	14	15	24	21	29	27	187 (100)
Subgrupo A Linajes															
A.2.1	2		1	2				1							6 (3.2)
A.2.2.1	7			2	6	1									16 (8.6)
A.2.2.2				1		3									4 (2.1)
A.2.2.2 (180dup)						1	7	9	13	1			3		34 (18.2)
A.2.2.2 (111dup)									1	1		2	26	25	55 (29.4)
Subgrupo B Linajes															
B.1		4			1	1				9	22	4			41 (21.9)
B.2		3	3	1	1					4	2	15		2	31 (16.6)

MPVh, metapneumovirus humano.

Distribución de los genomas completos de MPVh obtenidos entre 2006 y 2025, clasificados según los linajes del Grupo A (A.2.1, A.2.2.1, A.2.2.2 y sus variantes con inserciones 180dup y 111dup) y del Grupo B (B.1 y B.2), de acuerdo con el brote epidémico. Para el periodo 2006–2009, los genomas corresponden exclusivamente a muestras circulantes, ya que no se disponía de datos epidemiológicos que permitieran asociarlos a brotes específicos. La tabla muestra el número de genomas identificados por año y el porcentaje que representa cada linaje dentro del total de secuencias analizadas.

Finalmente, el análisis de asociación entre los subgrupos no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las características demográficas evaluadas: género ($p = 1.0$), estado clínico ($p = 0.81$), edad ($p = 0.92$) y área geográfica ($p = 0.39$). Sin embargo, dentro del subgrupo A sí se identificó una asociación significativa con el área geográfica ($p = 0.022$), destacándose que A2.2.2-180dup se detectó con mayor frecuencia en el resto del país, mientras que A2.2.2-111dup predominó en el Área Metropolitana y Periferia (AM&P). Estos resultados sugieren que, aunque los subgrupos se distribuyen de manera homogénea en la población, ciertos linajes del grupo A presentan diferencias geográficas, posiblemente vinculadas a dinámicas de introducción y dispersión. (Tabla XIII y Tabla XIV).

Tabla XIII. Linajes de MPVh involucradas en los brotes estacionales de 2006–2025 según las características clínicas y demográficas de los pacientes

Características	MPVh-A					Total MPVh-A	MPVh-B		Total MPVh-B	Total
	A.2.1	A.2.2.1	A.2.2.2	A.2.2.2 (180dup)	A.2.2.2 (111dup)		B.1	B.2		
Genomas	6	16	4	34	55	115	41	31	72	187
Género										
Masculino	1	9	4	20	33	67	25	18	43	110
Femenino	4	7		14	22	47	16	13	29	76
Sin Datos	1					1				1
Estado Clínico										
Hospitalizado	3	9	4	29	33	78	28	21	49	127
Ambulatorio	2	4		5	21	32	13	10	23	55
Fallecido					1	1				1
Sin Datos	1	3				4				4
Edad del Paciente, años										
< 1	3	9	3	20	19	54	22	11	33	87
1 - 4	1	3	1	8	26	39	14	12	26	65
5 - 49	1	4		5	8	18	4	6	10	28
≥50				1	2	3	1	2	3	6
Sin Datos	1					1				1
Área Geográfica										
AM&P	3	8	3	16	44	74	20	21	41	115
Resto del País	2	7	1	18	11	39	21	10	31	70
Sin Datos	1	1				2				2

MPVh, Metapneumovirus humano; AM&P, Área Metropolitana y Periferia

Tabla XIV. Asociación estadística entre los linajes de MPVh y las características demográficas mediante la prueba de chi-cuadrado de independencia.

Característica	Linajes					
	MPVh-A			MPVh-B		
	Chi Square	Degrees of Freedom	P-value	Chi Square	Degrees of Freedom	P-value
Género	5.984	4	0.200	0.062	1	0.803
Estado Clínico	7.871	4	0.096	0.002	1	0.960
Edad del Paciente	11.83	12	0.459	3.227	3	0.358
Área Geográfica	11.44	4	<u>0.022</u>	2.589	1	0.108

Los resultados chi-cuadrado y p-value obtenidos del análisis se muestran por linajes, separados por subgrupos. Para el estado clínico, en los linajes de MPVh-A la variable de fallecido no fue considerada debido a datos insuficientes. Las características con datos faltantes "Sin Datos" no fueron incluidas en el análisis estadístico. Resultados de OpenEpi, versión 3, la calculadora de código abierto RbyC (<https://www.openepi.com/RbyC/RbyC.htm>)

2.3 Análisis de la Proteína de Fusión

El análisis de divergencia de la proteína F en las 114 secuencias panameñas completas de MPVh-A recolectadas entre 2006 y 2025, tras excluir la cepa *hMPV/A/Panama/ICGES-165/2006* por falta de información genética, reveló una ligera variación a nivel nucleotídico, con una p-distance promedio de 2.10% (identidad promedio = 97.90%, rango: 95.06–100%) (Figura 27). y una variación aún menor a nivel de aminoácidos, con una p-distance promedio de 0.27% (identidad promedio = 99.73%, rango: 98.70–100%). La comparación con la referencia *hMPV/A/NC_039199*, correspondiente a una de las secuencias completas más antiguas disponibles y utilizada como referencia en GenBank, reveló siete sustituciones completamente fijadas en todas las cepas (R82K, A185D, F258I, G294E, S466N, T504S y N539S) (Tabla XV), localizadas en regiones tolerantes de la proteína F, incluyendo el dominio F2 (R82K), zonas internas del subdominio F1 (A185D, F258I y G294E) y segmentos distales asociados a la región transmembrana o la cola citoplasmática (S466N, T504S y N539S); sin comprometer la conformación prefusión ni los sitios antigénicos. Entre las mutaciones de frecuencia intermedia, V510I (86.8%) se ubicó en la región transmembrana (Tabla XV) y apareció exclusivamente a partir del linaje A2.2.2 y sus descendientes con duplicaciones en G, mientras que K518R (48.2%), situada en la cola citoplasmática (Tabla XV), se restringió al grupo portador de la duplicación de 111nt (111dup). Este patrón confirma que la variabilidad del MPVh-A se concentra en posiciones periféricas estructuralmente flexibles, sin evidencia de sustituciones que afecten dominios funcionales clave ni indicios de presión de escape inmunológico. (Figura 28)

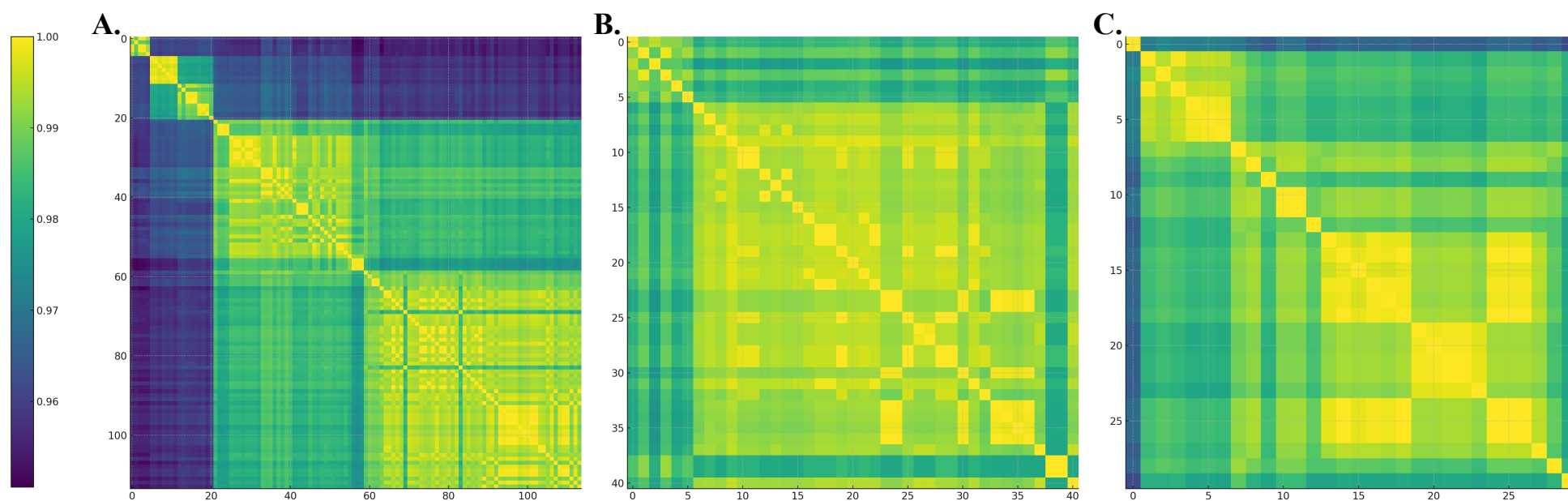


Figura 27. Matriz de identidad nucleotídica de la proteína F de MPVh en Panamá.(A) Subgrupo A (114 secuencias), (B) subgrupo B1 (41 secuencias) y (C) subgrupo B2 (30 secuencias). Cada panel muestra la identidad par-a-par entre secuencias de la proteína F, calculada a partir de alineamientos completos de nucleótidos. La misma escala de colores se aplica a los tres paneles, donde valores cercanos a 1 reflejan alta identidad y tonos más oscuros representan menor similitud. Los patrones en bloques evidencian agrupamientos internos y niveles diferenciales de conservación dentro de cada subgrupo viral

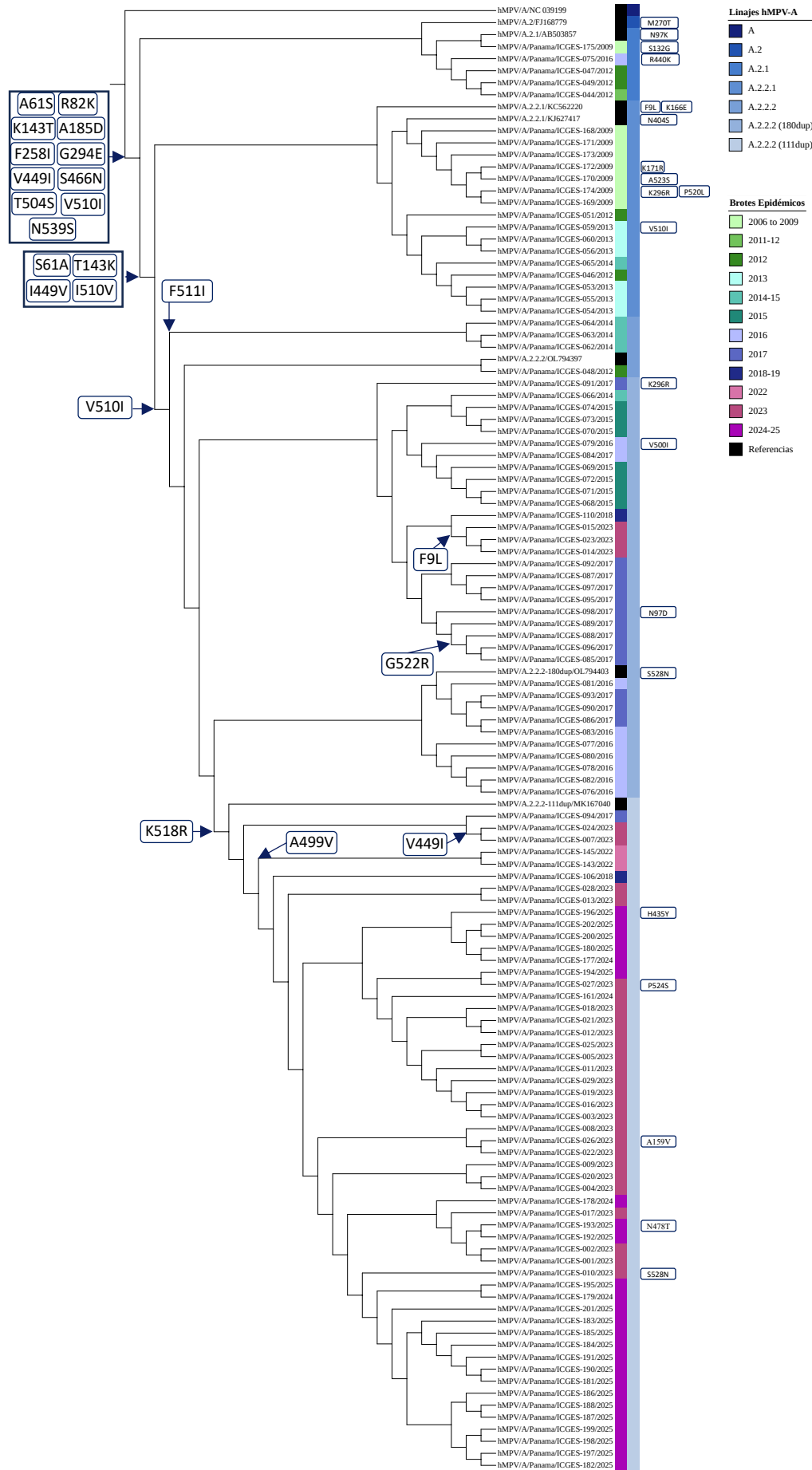


Figura 28. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen de la proteína F de MPVh-A, comparado con la referencia *hMPV/A/NC_039199*. Los linajes (A2, A2.1, A2.2.1, A2.2.2 y variantes con duplicaciones de 180 nt y 111 nt) se representan en la barra externa con distintos tonos de azul, mostrando el reemplazo sucesivo de linajes a lo largo del periodo. La barra interna indica el brote estacional de cada secuencia, permitiendo visualizar su distribución temporal. En los nodos internos se muestran las mutaciones ancestrales compartidas por cada clado, mientras que las sustituciones puntuales no adaptativas aparecen a la derecha del nombre de cada cepa. La secuencia *hMPV/A/Panama/ICGES-165/2006* fue excluida por falta de información genética. La visualización y anotación se realizaron en iTOL (<https://itol.embl.de/>).

De manera similar, el análisis de divergencia de la proteína F de las 41 secuencias panameñas de MPVh-B.1 analizadas entre 2010 y 2022 mostró una divergencia extremadamente baja. A nivel de nucleótidos, mostraron una p-distance promedio de 1.0% (identidad promedio de 99.0%, rango de identidad: 97.6–100%) (Figura 27), mientras que a nivel de aminoácidos la p-distance promedio fue de 0.1% (identidad promedio 99.9%, rango: 99.3–100%). En comparación con la referencia *hMPV/B.1/KC403974*, correspondiente a una de las secuencias completas más antiguas disponibles y utilizada como referencia en análisis de genoma completo, se identificaron seis sustituciones fijadas (K179R, E306D, D475E, R479K, K518R y K521T), todas ubicadas fuera de los principales determinantes antigénicos descritos para la proteína F (Tabla XV). Los cambios en F2 (K179R) y F1 (E306D) se encuentran en superficies con baja contribución a epítomos conformacionales, mientras que las variaciones situadas cerca de la región transmembrana o en la cola citoplasmática (D475E, R479K, K518R y K521T) corresponden a zonas que no participan en los sitios antigénicos predominantes (Tabla XV). Las sustituciones esporádicas y de muy baja frecuencia (A523V, T411A, I495V y T504A) se localizaron igualmente en regiones periféricas sin asociación conocida a epítomos de neutralización. Este patrón indica que, en el subgrupo B1, la diversidad detectada no involucra posiciones clave para el reconocimiento inmunitario, lo que refuerza la conservación de los sitios antigénicos relevantes a lo largo del periodo analizado. (Figura 29)

En el caso del subgrupo B2, el análisis de divergencia de la proteína F en 30 secuencias panameñas colectadas entre 2010 y 2025, tras excluir la muestra *hMPV/B/Panama/ICGES-176/2024* debido a su cobertura parcial y ausencia de regiones clave en el gen F, reveló una p-distance promedio de 1.24% a nivel de nucleótidos (identidad promedio de 98.76%, rango: 96.17–100%) (Figura 27) y una p-distance promedio de 0.44% a nivel de aminoácidos (identidad promedio de 99.56%, rango: 97.78–100%). Al comparar las secuencias del subgrupo B2 con la referencia *hMPV/B.2/KC562232*, se identificaron mutaciones de alta frecuencia: T223N, D280N, I392T, R396Q, K450R, S444N y T521A (Tabla XV). Aunque estas sustituciones aparecen ampliamente distribuidas dentro del linaje, su localización periférica o con contribución antigénica limitada indica que su expansión probablemente no afecte los determinantes críticos del reconocimiento inmunitario. Las variaciones esporádicas de muy baja frecuencia mostraron un patrón similar, sin involucrar posiciones clave de la conformación prefusión. A pesar de que el subgrupo B2 presenta una variabilidad ligeramente mayor que B1, la preservación de los sitios antigénicos relevantes confirma que la proteína F mantiene su conservación característica dentro del periodo estudiado. (Figura 29)

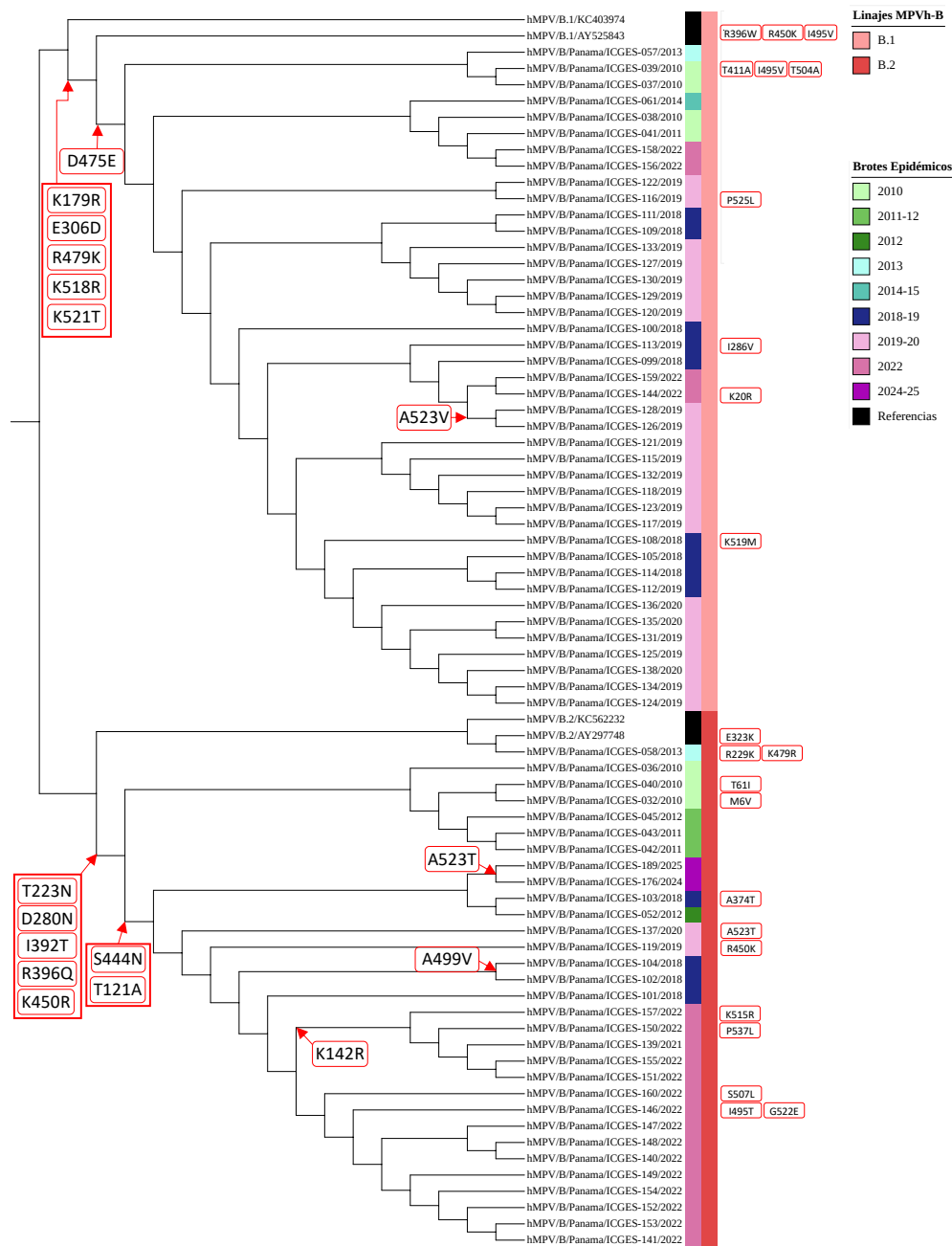


Figura 29. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la proteína F de MPVh-B, comparado con la secuencia de referencia del grupo B. En la barra externa se distinguen los linajes B1 y B2, mientras que la barra interna muestra el brote estacional asignado a cada aislamiento. Las mutaciones ancestrales que caracterizan cada clado se indican en rojo sobre los nodos internos, representando cambios compartidos por todas las secuencias descendientes. A la derecha del nombre de cada cepa se muestran las sustituciones puntuales no adaptativas detectadas en aislados individuales. El árbol fue visualizado y anotado con iTOL (<https://itol.embl.de/>)

Tabla XV. Sustituciones aminoacídicas en la proteína F de MPVh en los subgrupos A, B1 y B2 durante 2006–2025

Dominio	Posiciones (aa)	MPVh-A	MPVh-B (B1)	MPVh-B (B2)
Péptido señal	1–22	F9L (3)	K20R (1)	M6V (1)
Subunidad F2	23–102	R82K*, A61S (5), N97D (1)	–	T61I (1)
Sitio de corte	102–103	–	–	–
Péptido de fusión	103–125	–	–	–
Hélice Repetida A (HRA)	131–172	S132G (1), K143T (5), K171R (1)	–	K142R (6)
Subunidad F1	173–453	A185D*, F258I*, G294E*, K296R (2), H435Y (1), V449I (7)	K179R*, E306D*, I286V (1), T411A (1)	T223N (29), R229K (1), D280N (29), A374T (1), I392T (30), R396Q (30)
Hélice Repetida B (HRB)	454–486	S466N*, N478T (1)	D475E*, R479K*	K479R (1)
Región transmembrana	490–514	T504S*, A499V (2), V500I (1), V510I (99), F511I (3)	I495V (1), T504A (1)	I495T (1), A499V (2), S507L (1)
Cola citoplasmática	515–539	K518R (55), G522R (3), P524S (1), P520L (1), S528N (1), N539S*	K518R*, K521T*, K519M (1), A523V (2), P525L (1)	K515R (1), T521A (24), G522E (1), A523T (3), P537L (1)

Mutaciones aminoacídicas identificadas en la proteína F de MPVh a partir de genomas completos obtenidos entre 2006 y 2025 en Panamá. Las mutaciones se agrupan según los dominios estructurales de la proteína e incluyen la frecuencia de aparición dentro de cada subgrupo (A, B1 y B2). Las sustituciones fijadas o consistentes en un subgrupo se indican con un asterisco *, mientras que las mutaciones presentes en una fracción de aislamientos se muestran con el número de secuencias que las contienen (n). Para el análisis comparativo, se emplearon como referencias las secuencias *hMPV/A/NC_039199* (subgrupo A), *hMPV/B.1/KC403974* (subgrupo B1) y *hMPV/B.2/KC562232* (subgrupo B2), seleccionadas por su posición representativa dentro de los árboles filogenéticos mostrados en las Figuras 28 y 29.

3. DISCUSIÓN

Los patrones estacionales observados en Panamá, caracterizados por brotes recurrentes durante la temporada lluviosa, son consistentes con lo reportado en otros países tropicales y subtropicales, donde la actividad del MPVh tiende a intensificarse en periodos de mayor humedad (Lianou et al., 2025). A diferencia de las regiones templadas, donde los picos de circulación se concentran a finales del invierno e inicios de primavera (Lianou et al., 2025), en zonas tropicales la transmisión puede extenderse por varios meses y abarcar la transición entre años, tal como se evidenció en este estudio. Hallazgos similares han sido descritos en cohortes longitudinales, como la de Managua, Nicaragua, donde se documentaron temporadas prolongadas y recurrentes con alta carga en población pediátrica (Hacker et al., 2022). La persistencia de brotes en Panamá durante casi dos décadas apunta a una transmisión sostenida, un comportamiento que también ha sido reportado en otras regiones tropicales en las que se evidencian múltiples introducciones virales y circulación prolongada (Kadjo et al., 2025). En este contexto, resulta fundamental mantener esfuerzos sistemáticos de caracterización virológica y genómica que permitan comprender la dinámica del MPVh en el país y anticipar posibles cambios relevantes ante el desarrollo futuro de estrategias terapéuticas o preventivas dirigidas contra este virus

Con respecto a la frecuencia de detección, la positividad observada en Panamá (6.7% de los virus identificados, excluyendo SARS-CoV-2) muestra que el MPVh representa una fracción consistente y clínicamente relevante dentro de las infecciones respiratorias detectadas en el país. Este valor se encuentra alineado con reportes recientes de otras regiones. En el norte de China, por ejemplo, el MPVh representó el 6.2% de todas las pruebas positivas para infecciones respiratorias durante el aumento observado entre finales de 2024 e inicios de

2025 (Satapathy et al., 2025) , mientras que estudios hospitalarios en Latinoamérica han descrito proporciones similares en poblaciones pediátricas (Hacker et al., 2022; Narro Flores et al., 2025). Las estimaciones globales indican que el MPVh puede detectarse en hasta el 11% de los casos de infección respiratoria baja (LRTI) en niños y contribuir al 4 -13% de las hospitalizaciones por LRTI (Wang et al., 2021), cifras que contextualizan la importancia clínica del virus y permiten interpretar los valores observados en Panamá dentro del rango esperado para este patógeno.

Las características demográficas y clínicas de nuestra cohorte, compuesta por 187 muestras con información genómica de MPVh (Tabla XI), reflejan un patrón similar al descrito en múltiples estudios internacionales. La mayor afectación en menores de un año (46.5%) y en niños de 1–4 años (34.8%) coincide con estudios que señalan que más del 70% de los casos y hospitalizaciones por MPVh ocurren en niños pequeños, especialmente en los primeros 3 años de vida (Papenburg et al., 2012; Sharipova et al., 2020). La alta proporción de pacientes hospitalizados en nuestra cohorte (67.9%) y la presencia de un caso fatal reflejan el impacto clínico del MPVh en la infancia panameña. Este patrón es consistente con el estudio INFLUMIKA, donde los primeros años de vida concentraron la mayor carga de infecciones respiratorias virales y se observó una incidencia notable de MPVh en lactantes y niños pequeños (Azziz-Baumgartner, Duca, Gonzalez, et al., 2022). Asimismo, la mayor proporción de varones observada en nuestra cohorte (58.8%) es consistente con datos descriptivos reportados en estudios hospitalarios, donde los casos positivos por MPVh muestran una ligera predominancia masculina (Hacker et al., 2022; Kadio et al., 2025). La predominancia de casos procedentes del Área Metropolitana y su Periferia es coherente con la distribución demográfica del país, ya que estas zonas concentran la mayor proporción de

la población. Además, el funcionamiento del sistema de vigilancia tiende a captar con mayor frecuencia los eventos generados en áreas con mayor actividad sanitaria, lo que contribuye a su mayor representación en el conjunto de muestras analizadas.

Los patrones de circulación observados en Panamá, caracterizados por la alternancia periódica entre los subgrupos A y B, coinciden con lo descrito en otras regiones donde el MPVh exhibe ciclos multianuales de reemplazo. Estudios realizados en América del Norte, Europa y China han documentado que los subgrupos tienden a predominar de manera alternada cada 1 a 4 años, en ocasiones vinculados a variaciones en la inmunidad poblacional o a la introducción de nuevos linajes virales (Aberle et al., 2010; Apostoli et al., 2012; Kong et al., 2016; Pless et al., 2025; Reiche et al., 2014). Los ciclos identificados en Panamá, con una duración media de 4 años y una probabilidad baja de mantenerse más allá de cinco, proporcionan una de las caracterizaciones más completas de esta dinámica en un entorno tropical, donde la estacionalidad respiratoria suele mostrar patrones menos definidos. La interrupción temporal de la circulación durante la pandemia de COVID-19, seguida de una rápida reactivación con un cambio en el subgrupo predominante, refleja además un fenómeno observado globalmente tras las medidas de mitigación que alteraron la transmisión de múltiples virus respiratorios (Franco et al., 2021; Huang et al., 2021)

La dinámica evolutiva del MPVh observada en Panamá entre 2006 y 2025 evidencia también desplazamientos sucesivos dentro del linaje A2, la expansión de variantes con duplicaciones en el gen G y los ciclos de resurgimiento de los linajes B1 y B2; reproduce y complementa las tendencias descritas globalmente, aportando además una de las cronologías más extensas documentadas en un país tropical. La evidencia histórica disponible para Panamá ya mostraba, durante 2010-2012, una alta heterogeneidad genética con circulación simultánea

de A2a, A2b, B1 y B2 y claro predominio de A2b (A2.2) (Ábrego et al., 2018), lo que mostraba la capacidad del ecosistema panameño para sostener diversidad viral elevada. Sobre este trasfondo, el presente estudio documenta la transición hacia un escenario dominado por A2.2.2, coincidencia notable con tendencias internacionales que muestran la diversificación acelerada del clado A2b (A2.2) y su diversificación en sublinajes de éxito epidemiológico (Heim et al., 2025).

En línea con estas tendencias, los análisis comparativos con otros países revelan patrones casi paralelos a los observados en Panamá. De forma similar a lo reportado en Argentina, donde entre 2011–2013 predominó el subtipo A2 y coexistieron múltiples sublinajes con alta identidad genética (Rodriguez et al., 2020), Panamá experimentó ciclos de reemplazo en los que A2.1 y A2.2.1, ampliamente distribuidos entre 2006 y 2014, fueron progresivamente desplazados por A2.2.2, un linaje cuya circulación global se ha documentado al menos desde 2008 (Nao et al., 2020b). En nuestro estudio, la primera detección local de A2.2.2 ocurrió en 2012, seguida por la aparición de la variante con duplicación de 180nt (180dup) en 2014 y, posteriormente, de la duplicación de 111nt (111dup) en 2017. Esta secuencia temporal reproduce el patrón descrito a nivel mundial, donde 180dup fue detectada primero y 111dup emergió posteriormente dentro del mismo linaje (Heim et al., 2025; Piñana et al., 2023; Saikusa et al., 2017). Aunque se ha propuesto que la duplicación de 111nt podría derivar de una variante previa con duplicación de 180nt (Goya et al., 2025), nuestro análisis de genomas completos infiere que ambas duplicaciones podrían corresponder a eventos evolutivos independientes dentro del linaje A2.2.2, en concordancia con las descripciones iniciales (Saikusa et al., 2017). Aunque estos análisis de genomas completos sugieren que 180dup y 111dup surgieron como eventos independientes dentro de A2.2.2, aún falta evidencia para

confirmar definitivamente su relación evolutiva; además, cada una sigue un patrón epidemiológico distinto, como se observa claramente en Panamá.

En este sentido, la variante A2.2.2-180dup se mantuvo en circulación activa durante casi una década (2014–2023), mientras que A2.2.2-111dup emergió en 2017 y, de forma similar con lo observado en España tras la reactivación post-pandemia, donde A2.2.2-111dup llegó a constituir prácticamente el único linaje del grupo A en circulación entre 2021 y 2022 (Piñana et al., 2023), pasó a convertirse en la variante dominante en los brotes panameños de 2023 y 2024–25. Esta expansión acelerada también ha sido documentada en Países Bajos, donde los virus A2.2.2 con duplicaciones se convirtieron en los genotipos más frecuentes desde 2015 y contribuyeron a la desaparición de linajes como A1, que no volvió a detectarse después de 2006 (Groen et al., 2023). En Estados Unidos, 111dup también se consolidó como la forma predominante de A2b2 (A2.2.2) tras la pandemia, sin evidenciar la emergencia de un linaje de preocupación, sino reflejando la expansión continua de variantes ya establecidas y adaptadas a contextos de inmunidad poblacional alterada por la interrupción de la circulación respiratoria durante la COVID-19 (Goya et al., 2025).

Un aspecto a considerar y hallazgo de este estudio ha sido la mayor frecuencia del linaje A2.2.2-111dup en el área Metropolitana y Periferia (AM&P) lo cual es coherente con el papel de esta zona como punto potencial de entrada viral, debido a su alta densidad poblacional y su conectividad aérea e internacional. Patrones similares se han descrito para VSRh, donde los linajes emergentes suelen introducirse primero en grandes centros urbanos antes de dispersarse hacia regiones periféricas (Langedijk et al., 2024; Zheng et al., 2021)

Paralelamente, los linajes B1 y B2 mostraron en Panamá un patrón de circulación caracterizado por persistencia a baja frecuencia y reemergencias periódicas, una dinámica consistente con lo descrito para el subgrupo B (Goya et al., 2025). El linaje B1, detectado por primera vez en Panamá en 2010, volvió a resurgir durante los brotes de 2018-2020, un comportamiento que coincide con reportes europeos donde B1 y B2 alternaron períodos de predominio antes de la pandemia (Piñana et al., 2023; Reiche et al., 2014). Por su parte, B2, que circuló entre 2010–2013 y reapareció en 2018–2020, pasó a predominar en 2022 y originó el primer brote post-pandemia en Panamá. Un patrón similar se describió en Corea del Sur en 2022, donde B2 volvió a circular tras un periodo prolongado de baja detección (Cho et al., 2023), y coincide con análisis filodinámicos que evidencian la capacidad del subgrupo B para resurgir de forma intermitente en distintos contextos epidemiológicos (Goya et al., 2025; Kamau et al., 2020). No obstante, este comportamiento contrasta con lo observado en otras regiones donde, tras la pandemia, el linaje que recuperó predominancia fue B1, como ocurrió en Israel en 2021 (Stein et al., 2022). Estos hallazgos sugieren que los linajes del subgrupo B siguen una dinámica propia marcada por alternancia, persistencia prolongada y picos intermitentes de actividad, y que, a diferencia del grupo A, los linajes B1 y B2 no muestran un patrón global uniforme, pueden predominar en diferentes regiones al mismo tiempo, de modo que B1 puede ser el linaje dominante en una región, mientras B2 domina simultáneamente en otra.

La trayectoria evolutiva registrada en Panamá coincide con las tendencias globales, como el desplazamiento sostenido hacia A2.2.2 y la expansión de duplicaciones en G, sino también la conservación de patrones locales de alternancia y co-circulación entre sublinajes A y B. En el subgrupo B, la persistencia y reemergencia de B1 y B2 a lo largo de un periodo

inusualmente extenso para un país tropical aporta una de las series más prolongadas de la región de Centroamérica y el Caribe, subrayando la continuidad de su circulación y la capacidad del virus para ajustarse a presiones evolutivas cambiantes.

El análisis evolutivo de la proteína F en las secuencias panameñas revela un nivel de conservación notable a lo largo de casi dos décadas de circulación viral. Las estimaciones de divergencia obtenidas en este estudio muestran una p-distance promedio baja en los tres conjuntos analizados: 2.10% en MPVh-A, 0.98% en MPVh-B1 y 1.24% en MPVh-B2 a nivel de nucleótidos. Este patrón es consistente con lo observado en un estudio longitudinal que incluyó 85 secuencias obtenidas durante un periodo aproximado de veinte años en diferentes regiones, donde también se reportaron identidades elevadas (96–99%) entre linajes y una evolución muy limitada de la proteína F, sin evidencia de deriva progresiva ni acumulación sostenida de mutaciones (Yang et al., 2009). No obstante, dicho estudio abarcó únicamente muestras previas a 2009, por lo que no incorporó variantes contemporáneas; en contraste, los datos panameños actualizan este panorama y confirman que la alta conservación de la proteína F se ha mantenido incluso en años recientes.

Las sustituciones identificadas en los subgrupos A, B1 y B2 para el gen F fueron evaluadas en relación con los residuos equivalentes del epítipo mínimo descrito para MPE8, un anticuerpo de amplio espectro dirigido al sitio antigénico III, también activo contra VSRh y con potencial terapéutico (Corti et al., 2013; Principi et al., 2025). En VSRh, este epítipo está definido por los residuos T50, L305, G307, I309 y D310, cuyos homólogos en MPVh corresponden a T41, I275, G277, I279 y D280 (Corti et al., 2013; Guo et al., 2023). En nuestras cepas, estas posiciones permanecieron invariantes en los subgrupos A y B1, mientras que en B2 se detectó la sustitución D280N, un cambio no conservador que altera la carga del

residuo pero no genera un motivo compatible con glicosilación *N-linked*. Aunque el impacto de D280N sobre la interacción con MPE8 no puede determinarse con los datos disponibles, su presencia subraya la necesidad de estudios funcionales que evalúen su posible relevancia estructural e inmunológica.

Otro anticuerpo con potencial terapéutico es 54G10 (Principi et al., 2025), el cual se une a un epítipo lineal centrado en el residuo 397, definido mediante mutantes de escape (V397G y Q434H) y equivalente al sitio antigénico IV de RSV (Schuster et al., 2015). En nuestros datos, ninguna de las sustituciones detectadas afectó directamente este núcleo crítico; sin embargo, una de las cepas presentó la mutación H435Y (*hMPV/A/Panama/ICGES-196/2025*) (Figura 28), un reemplazo por un aminoácido no polar que podría modificar el entorno inmediato del epítipo. Aunque su impacto funcional es incierto, este hallazgo resalta la necesidad de estudios experimentales para evaluar si cambios en posiciones cercanas podrían influir en la unión o sensibilidad frente a 54G10.

Un tercer anticuerpo en fase preclínica es DS7, que actúa sobre el sitio antigénico I de MPVh F al interactuar con un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Leu24, Ile31, Pro282 y Trp284 (Miller & Mousa, 2023). De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, ninguno de estos aminoácidos presentó sustituciones en las cepas panameñas analizadas, por lo que el entorno inmediato del sitio I se mantiene conservado en las secuencias evaluadas.

El análisis de la proteína F de MPVh en cepas panameñas indica que esta glicoproteína ha permanecido altamente conservada durante casi dos décadas. A pesar de la presencia de sustituciones fijadas en los subgrupos A, B1 y B2, estas se localizan mayoritariamente en

regiones periféricas o tolerantes, sin afectar los principales epítomos de neutralización ni los elementos estructurales que sostienen la conformación prefusión.

Entre los cambios observados, destaca la sustitución D280N en B2, ubicada en un residuo equivalente a un punto crítico del epítomo mínimo descrito para MPE8. Asimismo, en el subgrupo A se identificó la mutación H435Y, cercana al epítomo lineal reconocido por 54G10, cuya posible repercusión sobre la unión del anticuerpo requiere evaluación funcional. Otras mutaciones linaje-específicas, como V510I en A2.2.2 y K518R en variantes con duplicación de 111 nt, así como las variaciones de alta frecuencia detectadas en B2, no coincidieron con posiciones previamente implicadas en el reconocimiento inmunitario. La estabilidad evolutiva observada establece un perfil basal robusto de la proteína F de MPVh, relevante para el monitoreo de posibles desviaciones asociadas a presión inmunológica o a la introducción futura de antivirales o anticuerpos monoclonales.

4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que el MPVh ha circulado de forma sostenida en Panamá durante casi dos décadas, con patrones estacionales propios de regiones tropicales, alternancia periódica entre los subgrupos A y B, y ciclos de reemplazo que reproducen tendencias globales, incluyendo la expansión del linaje A2.2.2 y la aparición secuencial de las variantes con duplicaciones de 180 nt y 111 nt. La carga clínica observada, concentrada en lactantes y niños pequeños, coincide con lo reportado internacionalmente y subraya la relevancia del virus en la población pediátrica. A nivel genómico, la proteína F mostró un alto grado de conservación, con divergencias bajas y sustituciones mayoritariamente localizadas en regiones que no influyen en los principales sitios antigénicos; sin embargo, se identificaron dos cambios potencialmente relevantes: D280N en B2, equivalente a un residuo crítico del epítipo mínimo descrito para MPE8 y H435Y en A, ubicada cerca del epítipo reconocido por 54G10. Ninguna otra sustitución coincidió con posiciones clave asociadas a anticuerpos neutralizantes, lo que confirma la estabilidad evolutiva de F durante el periodo analizado y resalta el valor de estos datos como referencia para evaluar futuros cambios con posible impacto inmunológico o terapéutico.

Finalmente, la información generada a partir de este análisis constituye la base de un manuscrito científico que se encuentra actualmente en preparación para su eventual publicación.

CONCLUSIONES GENERALES: DINÁMICA EVOLUTIVA DE LOS VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO Y METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ, Y SUS IMPLICACIONES EN NUEVAS VACUNAS Y TRATAMIENTOS EN DESARROLLO

La evidencia integrada en esta tesis muestra que, en Panamá, el VSRh y el MPVh comparten una dinámica compleja pero coherente en el tiempo: circulación endémica de larga data, picos epidémicos anuales coincidentes con la temporada lluviosa y ciclos multianuales de reemplazo entre subgrupos y linajes. A partir del marco conceptual desarrollado en la introducción, que revisa desde la historia natural, la biología molecular y la clasificación hasta las herramientas diagnósticas y las intervenciones preventivas emergentes, los capítulos analíticos demuestran que Panamá no es un escenario periférico, sino un nodo activo donde convergen tendencias virales globales y particularidades epidemiológicas propias de un país tropical altamente conectado.

En el caso del VSRh, los análisis que abarcan casi dos décadas (2006–2017 y 2018–2024) muestran una alternancia marcada entre los subgrupos A y B, con ciclos de reemplazo y co-circulación de linajes que reflejan la dinámica descrita en múltiples regiones, pero documentada aquí con una resolución sin precedentes para Centroamérica. La adopción de la nueva clasificación basada en genomas completos permite reinterpretar retrospectivamente la circulación de genotipos históricos (NA1, ON1, BA9) bajo el lenguaje actual de linajes (A.3.1, A.D, B.D, etc.), y situar a Panamá dentro del mapa global de la diversidad del VSRh antes y después de la pandemia de COVID-19. La identificación de linajes post-pandemia como A.D.1, A.D.5.2, B.D.4.1.1 y B.D.E.1, junto con su asociación ocasional con mayor

hospitalización (particularmente en el caso de B.D.4.1.1), ilustra cómo las perturbaciones en la transmisión respiratoria pueden reconfigurar transitoriamente la composición genética del virus sin alterar, al menos por ahora, los determinantes clave de sensibilidad a anticuerpos monoclonales.

Los estudios fenotípicos frente a anticuerpos anti-F, tanto en cepas históricas (2009) como contemporáneas, convergen en una conclusión central: la proteína F del VSRh mantiene una diversidad limitada y una conservación notable de los epítomos críticos (especialmente Ø y II), incluso en presencia de sustituciones puntuales como D200N, N276S o cambios en p27 asociados a glicosilación. Las cepas panameñas evaluadas fueron altamente sensibles a anticuerpos monoclonales de uso clínico y en etapa preclínica (palivizumab/motavizumab, nirsevimab/MEDI8897*, clesrovimab/AM14, entre otros), con capacidad de neutralización comparables a las descritas internacionalmente. Este hallazgo, reiterado a lo largo de diferentes periodos epidémicos y linajes, refuerza la solidez de la proteína F como diana terapéutica y sugiere que, en el contexto pre-implementación de inmunoprofilaxis masiva, las variantes circulantes en Panamá no presentan evidencias de escape relevante a estos agentes.

De manera complementaria, el análisis genómico de MPVh entre 2006 y 2025 demuestra que este virus, aunque menos visible en la agenda de salud global, contribuye de forma sostenida a la carga de infección respiratoria aguda baja en la infancia panameña. La positividad cercana al 7%, la alta proporción de hospitalizaciones y la concentración de casos en menores de cinco años alinean a Panamá con las estimaciones de impacto clínico global de MPVh. Desde el punto de vista evolutivo, la trayectoria de los subgrupos A y B confirma ciclos de

predominio alternante y una marcada diversificación dentro del linaje A2, con transición desde A2.1 y A2.2.1 hacia un escenario dominado por A2.2.2 y, dentro de este, por variantes con duplicaciones de 180nt y 111nt en el gen G. La cronología documentada, emergencia de A2.2.2 en 2012, aparición de 180dup en 2014 y expansión de 111dup a partir de 2017, reproduce con notable precisión la secuencia reportada en otros países, pero aquí se describe de manera continua durante casi veinte años en un entorno tropical, aportando una de las series más largas disponibles para este virus.

La alta variabilidad de la proteína G de MPVh y la aparición de importantes cambios estructurales asociados a las duplicaciones contrastan con el alto grado de conservación observado en la proteína F, tanto en el grupo A, como dentro de los linajes B1 y B2. Las estimaciones de divergencia bajas y la ausencia de una deriva antigénica detectable, junto con la conservación de los residuos equivalentes a los epítomos reconocidos por anticuerpos de amplio espectro como MPE8, 54G10 y DS7, refuerzan la idea de que la proteína F del MPVh constituye una diana antigénica estable y atractiva para el desarrollo de vacunas y terapias. Las pocas sustituciones potencialmente relevantes identificadas (como D280N en B2 o H435Y en una cepa A2.2.2) se ubican en un escenario de alta conservación general y se destacan precisamente como puntos de partida para estudios funcionales futuros, más que como amenazas inminentes de escape.

Esta tesis demuestra que VSRh y MPVh en Panamá comparten un patrón de circulación endémica, alta carga en población pediátrica, ciclos de reemplazo entre subgrupos/linajes y una alta estabilidad evolutiva de la proteína F, a pesar de la intensa diversificación observada en otras proteínas de superficie como G. Esta combinación de plasticidad antigénica

periférica y conservación de epítomos funcionales clave es consistente con el desempeño observado de anticuerpos monoclonales y plataformas vacunales dirigidas a F, y sugiere un fundamento biológico favorable para estas estrategias, cuyo impacto poblacional y presión selectiva aún deberán evaluarse a medida que su uso se generalice. Al mismo tiempo, los datos generados establecen una línea basal única, pre y post-COVID-19, previa a la implementación de inmunoprofilaxis y a lo largo de casi dos décadas, que será indispensable para evaluar el impacto de nuevas vacunas y tratamientos en desarrollo en el contexto panameño.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A pesar de la robustez del análisis longitudinal y la integración de datos genómicos, epidemiológicos y fenotípicos, este estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse en la interpretación de los resultados. En primer lugar, el muestreo no fue completamente representativo en todos los años analizados ni en todos los brotes estacionales, lo que podría introducir sesgos en la estimación de la diversidad viral y la frecuencia de linajes circulantes. Asimismo, la dependencia del sistema de vigilancia, con mayor captación de casos hospitalarios y de áreas urbanas como el Área Metropolitana y su periferia, puede sobreestimar la carga en poblaciones pediátricas graves y subrepresentar infecciones leves o regiones con menor acceso al sistema de salud. Adicionalmente, no todos los linajes identificados pudieron ser evaluados fenotípicamente mediante ensayos de neutralización, lo que limita la extrapolación completa de los hallazgos sobre sensibilidad a anticuerpos monoclonales. Las interrupciones en la circulación viral durante la pandemia de COVID-19 también pudieron afectar la continuidad temporal de los patrones observados. Finalmente, aunque se analizaron regiones antigénicamente relevantes, la ausencia de

estudios funcionales extensivos para todos los sitios de la proteína F impide descartar completamente efectos sutiles sobre la antigenicidad o la biología viral. Estas limitaciones no invalidan los hallazgos principales, pero resaltan la necesidad de fortalecer la vigilancia continua, ampliar la cobertura geográfica y temporal, e integrar análisis funcionales en futuros estudios.

PERSPECTIVAS Y LÍNEAS FUTURAS

1. Vigilancia genómica integrada y sostenida para VSRh y MPVh

Los resultados de esta tesis evidencian la necesidad de consolidar la secuenciación genómica como componente rutinario de la vigilancia nacional de virus respiratorios. Una prioridad inmediata es integrar, de forma sistemática, la información genómica de VSRh y MPVh con datos clínicos, demográficos y de exposición (por ejemplo, uso de nirsevimab, vacunas maternas o futuras vacunas pediátricas), de manera que Panamá pueda detectar tempranamente cambios en la circulación de linajes, emergencias de variantes inusuales o patrones de severidad asociados a clados específicos. Esta integración situaría al país en una posición estratégica dentro de las redes regionales y globales de vigilancia.

2. Evaluación del impacto evolutivo de nuevas intervenciones frente a VSRh

El conjunto de datos presentado ofrece una línea de base excepcional para monitorear la respuesta del VSRh a la introducción de intervenciones preventivas, en particular los anticuerpos monoclonales de vida media extendida y las vacunas dirigidas a la proteína F. Una línea de trabajo clave será comparar la diversidad y estructura de linajes antes y después de la implementación de estas herramientas en Panamá, evaluando si surgen patrones de

selección positiva en F, redistribución de subgrupos o desplazamiento de linajes que hoy se asocian a mayor hospitalización. Estudios longitudinales que combinen genómica, neutralización in vitro y modelaje filodinámico permitirán anticipar y contextualizar cualquier señal de adaptación viral frente a la presión inmunológica inducida por estas intervenciones.

3. Fortalecimiento de la agenda de investigación traslacional en MPVh

Dado que no existen aún vacunas ni anticuerpos monoclonales licenciados contra MPVh, los hallazgos de esta tesis posicionan a Panamá como un escenario ideal para estudios traslacionales que evalúen candidatos dirigidos a la proteína F. La demostrada estabilidad antigénica de F, junto con la documentación detallada de linajes A2.2.2-180dup, A2.2.2-111dup, B1 y B2, ofrece un marco sólido para ensayos de neutralización con anticuerpos de amplio espectro como MPE8, 54G10 o DS7 usando potenciales aislados locales. A mediano plazo, el país podría participar en estudios multicéntricos de candidatos vacunales frente a MPVh, aprovechando la extensa línea base genómica y epidemiológica aquí descrita para interpretar cualquier señal de escape o cambio en la severidad clínica.

4. Ampliación del espectro poblacional y geográfico de los estudios

La presente tesis se centra, de forma intencionada, en la población pediátrica y en los casos captados por el Sistema de Vigilancia, con un peso importante del Área Metropolitana y su Periferia. Una siguiente etapa será extender estas observaciones a otros grupos de riesgo (adultos mayores, personas inmunocomprometidas, pacientes con comorbilidades crónicas) y a regiones con menor densidad poblacional o menor acceso sanitario. Esto permitirá determinar si determinados linajes de VSRh o MPVh se asocian de forma diferencial a

desenlaces específicos en subpoblaciones vulnerables y evaluar posibles gradientes espaciales en la introducción y propagación de linajes entre áreas urbanas y periféricas.

5. Análisis filodinámico y filogeográfico

El uso de modelos filodinámicos y reconstrucciones filogeográficas permitirá estimar tiempos de introducción, rutas de dispersión y patrones de expansión espacial de VSRh y MPVh en Panamá. La integración de enfoques coalescentes y modelos de difusión espacial contribuirá a identificar conexiones entre regiones del país y posibles vínculos con corredores internacionales de movilidad, fortaleciendo la interpretación evolutiva de los datos genómicos en un contexto regional y global.

6. Estudios funcionales y estructurales de mutaciones puntuales en la proteína F

Aunque las mutaciones detectadas en F de VSRh y MPVh no muestran, hasta la fecha, un impacto claro en la sensibilidad a anticuerpos monoclonales, la identificación de cambios en posiciones cercanas o equivalentes a epítomos críticos (como D200N y N276S en VSRh o D280N y H435Y en MPVh) justifica el desarrollo de estudios funcionales específicos. Ensayos de neutralización con paneles ampliados de MAbs, experimentos de ganancia/pérdida de función y modelaje estructural in silico podrían esclarecer si estas sustituciones alteran sutilmente la afinidad de unión o la estabilidad conformacional de F, particularmente en un contexto futuro de mayor presión inmunológica por intervenciones masivas.

7. Modelaje de la carga de enfermedad y optimización de estrategias preventivas

La caracterización detallada de la estacionalidad, los ciclos de reemplazo y la distribución por edad de VSRh y MPVh en Panamá proporciona insumos clave para el desarrollo de modelos matemáticos que estimen la carga de enfermedad atribuible a cada virus y proyecten el impacto potencial de diferentes estrategias de inmunización (por ejemplo, combinación de vacunación materna, inmunización pediátrica y uso estacional de anticuerpos monoclonales). Tales modelos podrían ayudar a definir ventanas óptimas de administración en un contexto tropical, donde la temporada epidémica se solapa con la estación lluviosa y puede extenderse varios meses.

8. Articulación regional y uso de Panamá como plataforma de referencia

Finalmente, la experiencia acumulada en esta tesis, que combina vigilancia epidemiológica, genómica, análisis evolutivo y ensayos fenotípicos, coloca a Panamá en una posición privilegiada para contribuir como centro de referencia regional en el estudio de VSRh y MPVh. La continuidad de estas líneas de trabajo, junto con el fortalecimiento de redes colaborativas con otros países de América Latina y del Caribe, permitirá no solo compartir datos y capacidades, sino también abordar preguntas regionales sobre dispersión de linajes, introducciones virales a través de corredores aéreos y marítimos y efecto de las intervenciones preventivas en distintos contextos socioepidemiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Al-Sharif, H., El-Kafrawy, S. A., Yousef, J. M., Kumosani, T. A., Kamal, M. A., Khathlan, N. A., Kaki, R. M., Alnajjar, A. A., & Azhar, E. I. (2020). Dominance of the ON1 genotype of RSV-A and BA9 genotype of RSV-B in respiratory cases from Jeddah, Saudi Arabia. *Genes*, *11*(11), 1323.
- Aberle, J. H., Aberle, S. W., Redlberger-Fritz, M., Sandhofer, M. J., & Popow-Kraupp, T. (2010). Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *29*(11), 1016–1018.
- Abou-El-Hassan, H., Massaad, E., Soudani, N., Assaf-Casals, A., Shaker, R., Lteif Khoury, M., Ghanem, S., Karam, M., Andary, R., & Saito, R. (2019). Detection of ON1 and novel genotypes of human respiratory syncytial virus and emergence of palivizumab resistance in Lebanon. *PLoS One*, *14*(2), e0212687.
- Ábrego, L. E., Delfraro, A., Franco, D., Castillo, J., Castillo, M., Moreno, B., López-Vergès, S., Pascale, J. M., & Arbiza, J. (2017). Genetic variability of human respiratory syncytial virus group B in Panama reveals a novel genotype BA14. *Journal of Medical Virology*, *89*(10), 1734–1742.
- Ábrego, L. E., Mirazo, S., Delfraro, A., Franco, D., Castillo, M., Gaitán, M., Castillo, J., Moreno, B., Pascale, J. M., & Arbiza, J. (2018). Genotypes of human metapneumovirus circulating during 2010–2012 in children from Panama. *Journal of Medical Virology*, *90*(3), 604–608. <https://doi.org/10.1002/jmv.24969>
- Abu-Raya, B., Viñeta Paramo, M., Reicherz, F., & Lavoie, P. M. (2023). Why has the epidemiology of RSV changed during the COVID-19 pandemic? In *eClinicalMedicine* (Vol. 61). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.102089>
- Acharya, A., & Byraredddy, S. N. (2025). Immunological insights into the re-emergence of human metapneumovirus. *Current Opinion in Immunology*, *94*, 102562.
- Adepoju, V. A., Adnani, Q. E. S., Jamil, S., Mohammadnezhad, M., & Abdulrahim, A. (2025). Global Burden of Human Metapneumovirus: Bridging Gaps in Prevention, Diagnostics and Treatment. *Public Health Challenges*, *4*(3). <https://doi.org/10.1002/puh2.70094>
- Agha, R., & Avner, J. R. (2021). Delayed seasonal RSV surge observed during the COVID-19 pandemic. *Pediatrics*, *148*(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2021-052089>
- Ahani, B., Tuffy, K. M., Aksyuk, A. A., Wilkins, D., Abram, M. E., Dagan, R., Domachowske, J. B., Guest, J. D., Ji, H., Kushnir, A., Leach, A., Madhi, S. A., Mankad, V. S., Simões, E. A. F., Sparklin, B., Speer, S. D., Stanley, A. M., Tabor, D. E., Hamrén, U. W., ... Villafana, T. (2023). Molecular and phenotypic characteristics of RSV infections in infants during two nirsevimab randomized clinical trials. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40057-8>
- Alandijany, T. A., & Qashqari, F. S. (2025). Evaluating the efficacy, safety, and immunogenicity of FDA-approved RSV vaccines: a systematic review of Arexvy, Abrysvo, and mResvia. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1624007>
- Alfano, F., Bigoni, T., Caggiano, F. P., & Papi, A. (2024). Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults: An Update. In *Drugs and Aging* (Vol. 41, Number 6, pp. 487–505). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40266-024-01118-9>

- Anderson, L. J., Dormitzer, P. R., Nokes, D. J., Rappuoli, R., Roca, A., & Graham, B. S. (2013). Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine*, 31, B209–B215.
- Anderson, L. J., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B. F., Stone, Y., & McIntosh, K. (1985). Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains with Monoclonal Antibodies. In *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* • (Vol. 151). <http://jid.oxfordjournals.org/>
- Apostoli, P., Zicari, S., Presti, A. Lo, Ciccozzi, M., Ciotti, M., Caruso, A., & Fiorentini, S. (2012). Human metapneumovirus-associated hospital admissions over five consecutive epidemic seasons: evidence for alternating circulation of different genotypes. *Journal of Medical Virology*, 84(3), 511–516.
- Asseri, A. A. (2025). Respiratory Syncytial Virus: A Narrative Review of Updates and Recent Advances in Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Management and Prevention. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 14, Number 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/jcm14113880>
- August, A., Shaw, C. A., Lee, H., Knightly, C., Kalidindia, S., Chu, L., Essink, B. J., Seger, W., Zaks, T., & Smolenov, I. (2022). Safety and immunogenicity of an mRNA-based human metapneumovirus and parainfluenza virus type 3 combined vaccine in healthy adults. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(7), ofac206.
- Azziz-Baumgartner, E., Duca, L. M., Gonzalez, R., Calvo, A., Cornelia Kaydos-Daniels, S., Olson, N., MacNeil, A., Veguilla, V., Domínguez, R., Vicari, A., Rauda, R., Vuong, N., María Roperó, A., Armero, J., Porter, R., Franco, D., Miguel Pascale, J., & Salvador, E. (2022). Incidence of respiratory virus illness and hospitalizations in a Panama and El Salvador birth cohort, 2014–2018. *The Lancet Regional Health - Americas*, 13, 100304. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100304>
- Azziz-Baumgartner, E., Duca, L. M., González, R., Calvo, A., Kaydos-Daniels, S. C., Olson, N., MacNeil, A., Veguilla, V., Domínguez, R., Vicari, A., Rauda, R., Vuong, N., Roperó, A. M., Armero, J., Porter, R., Franco, D., & Pascale, J. M. (2022). Incidence of respiratory virus illness and hospitalizations in a Panama and El Salvador birth cohort, 2014–2018. *The Lancet Regional Health - Americas*, 13, 100304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100304>
- Bächi, T., & Howe, C. (1973). Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 12(5), 1173–1180.
- Bakkers, M. J. G., Ritschel, T., Tiemessen, M., Dijkman, J., Zuffianò, A. A., Yu, X., van Overveld, D., Le, L., Voorzaat, R., & van Haaren, M. M. (2024). Efficacious human metapneumovirus vaccine based on AI-guided engineering of a closed prefusion trimer. *Nature Communications*, 15(1), 6270.
- Banerjee, A., Huang, J., Rush, S. A., Murray, J., Gingerich, A. D., Royer, F., Hsieh, C.-L., Tripp, R. A., McLellan, J. S., & Mousa, J. J. (2022). Structural basis for ultrapotent antibody-mediated neutralization of human metapneumovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(25), e2203326119.
- Bao, X., Kolli, D., Liu, T., Shan, Y., Garofalo, R. P., & Casola, A. (2008). Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-κB transcriptional activity. *Journal of Virology*, 82(16), 8224–8229.
- Bao, X., Liu, T., Shan, Y., Li, K., Garofalo, R. P., & Casola, A. (2008). Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathogens*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000077>

- Bar-Peled, Y., Diaz, D., Pena-Briseno, A., Murray, J., Huang, J., Tripp, R. A., & Mousa, J. J. (2019). A potent neutralizing site III-specific human antibody neutralizes human metapneumovirus in vivo. *Journal of Virology*, 93(19), 10–1128.
- Battles, M. B., Más, V., Olmedillas, E., Cano, O., Vázquez, M., Rodríguez, L., Melero, J. A., & McLellan, J. S. (2017). Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01708-9>
- Battles, M. B., & McLellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 233–245.
- Bergeron, H. C., & Tripp, R. A. (2021). Immunopathology of RSV: an updated review. *Viruses*, 13(12), 2478.
- Bharaj, P., Sullender, W. M., Kabra, S. K., Mani, K., Cherian, J., Tyagi, V., Chahar, H. S., Kaushik, S., Dar, L., & Broor, S. (2009). Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virology Journal*, 6(1), 89.
- Bhattacharya, S., Bhattacharjee, S., & Singh, A. (2025). Human Metapneumovirus: A Comprehensive Epidemiological Analysis of a Global Respiratory Threat. In *Infection and Chemotherapy* (Vol. 57, Number 2, pp. 194–202). Korean Society of Infectious Diseases, Korean Society for Antimicrobial Therapy, Korean Society for AIDS, Korean Society of Pediatric Infectious Diseases. <https://doi.org/10.3947/ic.2025.0019>
- Biacchesi, S., Murphy, B. R., Collins, P. L., & Buchholz, U. J. (2007). Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro. *Journal of Virology*, 81(11), 6057–6067.
- Bian, T., Gibbs, J. D., Örvell, C., & Imani, F. (2012). Respiratory syncytial virus matrix protein induces lung epithelial cell cycle arrest through a p53 dependent pathway. *PLoS One*, 7(5), e38052.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1998). Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *Bmj*, 317(7172), 1572–1580.
- Boccard, V., Prevost, B., Denamur, S., Peulier-Maitre, E., Nathan, N., & Corvol, H. (2024). Bronchiolitis: Increased severity in the post-COVID-19 era. *Pediatric Pulmonology*, 59(12), 3197–3203. <https://doi.org/10.1002/ppul.27172>
- Bohmwald, K., Espinoza, J. A., Rey-Jurado, E., Gómez, R. S., González, P. A., Bueno, S. M., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2016). Human respiratory syncytial virus: infection and pathology. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(04), 522–537.
- Boivin, G., De Serres, G., Côté, S., Gilca, R., Abed, Y., Rochette, L., Bergeron, M. G., & Déry, P. (2003). Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerging Infectious Diseases*, 9(6), 634.
- Bonney, D., Razali, H., Turner, A., & Will, A. (2009). Successful treatment of human metapneumovirus pneumonia using combination therapy with intravenous ribavirin and immune globulin. *British Journal of Haematology*, 145(5), 667–669.
- Bukreyev, A., Yang, L., & Collins, P. L. (2012). The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement. *Journal of Virology*, 86(19), 10880–10884.
- Bukreyev, A., Yang, L., Fricke, J., Cheng, L., Ward, J. M., Murphy, B. R., & Collins, P. L. (2008). The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and

- through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *Journal of Virology*, 82(24), 12191–12204.
- Cao, D., Gao, Y., & Liang, B. (2021). Structural insights into the respiratory syncytial virus RNA synthesis complexes. *Viruses*, 13(5), 834.
- Carbonell-Estrany, X., Simões, E. A. F., Bont, L., Manzoni, P., Zar, H. J., Greenough, A., Ramilo, O., Stein, R., Law, B., & Mejias, A. (2025). Twenty-five years of palivizumab: a global historic review of its impact on the burden of respiratory syncytial virus disease in children. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 23(6), 359–378.
- Carter, S. D., Dent, K. C., Atkins, E., Foster, T. L., Verow, M., Gorny, P., Harris, M., Hiscox, J. A., Ranson, N. A., & Griffin, S. (2010). Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Letters*, 584(13), 2786–2790.
- Castilow, E. M., Olson, M. R., & Varga, S. M. (2007). Understanding respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease. *Immunologic Research*, 39(1), 225–239.
- Chakraborty, A. K. (2025). *Mechanisms of G-gene heterogeneities and a new method of genotyping of human metapneumovirus*. <https://doi.org/10.1101/2025.03.10.642527>
- Chanock, R., & Finberg, L. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA) epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *American Journal of Epidemiology*, 66(3), 291–300.
- Chen, J., Qiu, X., Avadhanula, V., Shepard, S. S., Kim, D. K., Hixson, J., Piedra, P. A., & Bahl, J. (2022). Novel and extendable genotyping system for human respiratory syncytial virus based on whole-genome sequence analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(3), 492–500. <https://doi.org/10.1111/irv.12936>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Cheng, C. H., Chow, C. L., & Chow, W. K. (2020). Trajectories of large respiratory droplets in indoor environment: A simplified approach. *Building and Environment*, 183, 107196.
- Cheng, X., Park, H., Zhou, H., & Jin, H. (2005). Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *Journal of Virology*, 79(22), 13943–13952.
- Chintha, P., Wloga, E., Kamat, V., Duan, X., & Perez-Caballero, D. (2014). REGN222, a potent neutralizing antibody. *9th International Respiratory Syncytial Virus Symposium*, 9–13.
- Cho, S.-J., Kim, S.-H., Lee, H., Lee, Y.-U., Mun, J., Park, S., Park, J., Park, J.-S., Lee, K., Lee, C., Seo, J., Kim, Y., & Chung, Y.-S. (2023). *Re-emergence of HMPV in Gwangju, South Korea, After the COVID-19 Pandemic: Impact on Subtypes and Age Distribution*. <https://doi.org/10.20944/preprints202308.0015.v1>
- Cingoz, O. (2009). Motavizumab. *MAbs*, 1(5), 439–442. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9496>
- Collins, P. L., Fearn, R., & Graham, B. S. (2013). Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. In *Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines* (pp. 3–38). Springer.

- Collins, P. L., Huang, Y. T., & Wertz, G. W. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 7683–7687.
- Collins, P. L., & Mottet, G. (1992). Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *Journal of General Virology*, 73(4), 849–863.
- Collins, P. L., & Mottet, G. (1993). Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, 74(7), 1445–1450.
- Corti, D., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Perez, L., Agatic, G., Guarino, B., Silacci, C., Marcandalli, J., & Marsland, B. J. (2013). Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*, 501(7467), 439–443.
- Couto, P., Campbell, H., Li, Y., Rondy, M., Leite, J., Rodriguez, A., Vicari, A., & Nair, H. (2025). Characterisation of the respiratory syncytial virus seasonality and its environmental factors in the Americas—a multi-country observational study using routine surveillance networks. *The Lancet Regional Health - Americas*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2025.101166>
- Cuevas, L. E., Nasser, A. M. Ben, Dove, W., Gurgel, R. Q., Greensill, J., & Hart, C. A. (2003). Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(12), 1626.
- Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A., & Wu, H. (2006). Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23514–23524.
- de Graaf, M., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., & Holmes, E. C. (2008). Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *Journal of General Virology*, 89(12), 2933–2942.
- Decool, H., Gonnin, L., Gutsche, I., Sizun, C., Eléouët, J.-F., & Galloux, M. (2021). Interactions between the nucleoprotein and the phosphoprotein of pneumoviruses: structural insight for rational design of antivirals. *Viruses*, 13(12), 2449.
- Detalle, L., Stohr, T., Palomo, C., Piedra, P. A., Gilbert, B. E., Mas, V., Millar, A., Power, U. F., Stortelers, C., & Allosery, K. (2016). Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 6–13.
- Ditt, V., Lüsebrink, J., Tillmann, R. L., Schildgen, V., & Schildgen, O. (2011). Respiratory infections by HMPV and RSV are clinically indistinguishable but induce different host response in aged individuals. *PloS One*, 6(1), e16314.
- Duan, Y., Liu, Z., Zang, N., Cong, B., Shi, Y., Xu, L., Jiang, M., Wang, P., Zou, J., & Zhang, H. (2024). Landscape of respiratory syncytial virus. *Chinese Medical Journal*, 137(24), 2953–2978.
- Eisenhut, M. (2006). Extrapulmonary manifestations of severe respiratory syncytial virus infection—a systematic review. *Critical Care*, 10(4), R107.
- Eshaghi, A., Duvvuri, V. R., Lai, R., Nadarajah, J. T., Li, A., Patel, S. N., Low, D. E., & Gubbay, J. B. (2012). Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PloS One*, 7(3), e32807.
- Esposito, S., Piralla, A., Zampiero, A., Bianchini, S., Di Pietro, G., Scala, A., Pinzani, R., Fossali, E., Baldanti, F., & Principi, N. (2015). Characteristics and their clinical

- relevance of respiratory syncytial virus types and genotypes circulating in Northern Italy in five consecutive winter seasons. *PLoS One*, 10(6), e0129369.
- Evelyn, O., Jaime, F.-S., David, M., Lorena, A., Jenifer, A., & Oscar, G. (2019). Prevalence, clinical outcomes and rainfall association of acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in Bogotá, Colombia. *BMC Pediatrics*, 19(1), 345.
- Falsey, A. R. (2008). Human metapneumovirus infection in adults. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10), S80–S83.
- Falsey, A. R., Erdman, D., Anderson, L. J., & Walsh, E. E. (2003). Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(5), 785–790.
- Falsey, A. R., & Walsh, E. E. (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 371–384.
- Fan, R., Fan, C., Zhang, J., Wen, B., Lei, Y., Liu, C., Chen, L., Liu, W., Wang, C., & Qu, X. (2017). Respiratory syncytial virus subtype ON1/NA1/BA9 predominates in hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Journal of Medical Virology*, 89(2), 213–221.
- FDA. (2024a). *Respiratory Syncytial Virus (RSV) | FDA*. <https://www.fda.gov/consumers/covid-19-flu-and-rsv/respiratory-syncytial-virus-rsv>
- FDA. (2024b, December 12). *Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting | Food and Drug Administration*. <https://www.fda.gov/advisory-committees/advisory-committee-calendar/vaccines-and-related-biological-products-advisory-committee-december-12-2024-meeting-announcement>
- Feldman, S. A., Hendry, R. M., & Beeler, J. A. (1999). Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *Journal of Virology*, 73(8), 6610–6617.
- Förster, A., Maertens, G. N., Farrell, P. J., & Bajorek, M. (2015). Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 89(8), 4624–4635.
- Franco, D., Gonzalez, C., Abrego, L. E., Carrera, J.-P., Diaz, Y., Caicedo, Y., Moreno, A., Chavarria, O., Gondola, J., Castillo, M., Valdespino, E., Gaitán, M., Martínez-Mandiche, J., Hayer, L., Gonzalez, P., Lange, C., Molto, Y., Mojica, D., Ramos, R., ... Valle del Lili, F. (2021). Early Transmission Dynamics, Spread, and Genomic Characterization of SARS-CoV-2 in Panama. *Emerging Infectious Diseases* • *Www.Cdc.Gov/Eid* •, 27(2). <https://doi.org/10.3201/eid2702.203767>
- Fridman, A., Love-Gregory, L., Railkar, R., Levitan, D., Strizki, J., & Vora, K. A. (2025). P-2334. Clesrovimab Binding Site Conservation on the RSV F Protein: An Evaluation of RSV Molecular Sequencing Data from 2019-2023 and GenBank Sequence Analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 12(Supplement_1), ofae631-2486.
- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N., & He, B. (2007). Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of Virology*, 81(15), 8361–8366.
- Gan, S.-W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G. M.-Y., Vararattanavech, A., Yeo, C. Y., Soon, C. H., & Soong, T. W. (2012). The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24671–24689.

- Garcia, O., Martin, M., Dopazo, J., Arbiza, J., Frabasile, S., Russi, J., Hortal, M., Perez-Brena, P., Martinez, I., Garcia-Barreno, B., & Melero, J. A. (1994). Evolutionary Pattern of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A): Cocirculating Lineages and Correlation of Genetic and Antigenic Changes in the G Glycoprotein. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 68, Number 9). <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Garcia-Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez-Brena, P., & Melero, J. A. (1989). Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *Journal of Virology*, 63(2), 925–932.
- Garg, A., Singh, R., Gupta, D., Nayak, S., & Gambhir, R. S. (2025). Human Metapneumovirus (HMPV): Current insights and future perspectives. In *Przegląd epidemiologiczny* (Vol. 79, Number 2, pp. 178–186). <https://doi.org/10.32394/pe/206000>
- Gilman, M. S. A., Castellanos, C. A., Chen, M., Ngwuta, J. O., Goodwin, E., Moin, S. M., Mas, V., Melero, J. A., Wright, P. F., Graham, B. S., McLellan, J. S., & Walker, L. M. (2016). Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Science Immunology*, 1(6), eaaj1879. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaj1879>
- Gilman, M. S. A., Liu, C., Fung, A., Behera, I., Jordan, P., Rigaux, P., Ysebaert, N., Tcherniuk, S., Sourimant, J., & Eléouët, J.-F. (2019). Structure of the respiratory syncytial virus polymerase complex. *Cell*, 179(1), 193–204.
- Gilman, M. S. A., Moin, S. M., Mas, V., Chen, M., Patel, N. K., Kramer, K., Zhu, Q., Kabeche, S. C., Kumar, A., Palomo, C., Beaumont, T., Baxa, U., Ulbrandt, N. D., Melero, J. A., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2015). Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein. *PLoS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005035>
- González-Reyes, L., Ruiz-Argüello, M. B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J. A., Albar, J. P., Skehel, J. J., Wiley, D. C., & Melero, J. A. (2001). Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9859–9864.
- Gorman, J. J., Ferguson, B. L., Speelman, D., & Mills, J. (1997). Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Science*, 6(6), 1308–1315.
- Gote, V., Bolla, P. K., Kommineni, N., Butreddy, A., Nukala, P. K., Palakurthi, S. S., & Khan, W. (2023). A comprehensive review of mRNA vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2700.
- Goya, S., Galiano, M., Nauwelaers, I., Trento, A., Openshaw, P. J., Mistchenko, A. S., Zambon, M., & Viegas, M. (2020). Toward unified molecular surveillance of RSV: A proposal for genotype definition. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(3), 274–285.
- Goya, S., Lucion, M. F., Shilts, M. H., Del Valle Juárez, M., Gentile, A., Mistchenko, A. S., Viegas, M., & Das, S. R. (2023). *Evolutionary dynamics of respiratory syncytial virus in Buenos Aires: Viral diversity, migration, and subgroup replacement*. <https://orcid.org/0000-0003-2496-9724>

- Goya, S., Nunley, E. B., Longley, P. C., Mathis, J. R., Varela, C. G., Kim, D. Y., Nurik, M., Naccache, S. N., & Greninger, A. L. (2025). Phylodynamics of human metapneumovirus and evidence for a duplication-deletion model in G gene variant evolution. *Journal of Clinical Virology*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2025.105848>
- Goya, S., Ruis, C., Neher, R. A., Meijer, A., Aziz, A., Hinrichs, A. S., von Gottberg, A., Roemer, C., Amoako, D. G., Acuña, D., McBroome, J., Otieno, J. R., Bhiman, J. N., Everatt, J., Muñoz-Escalante, J. C., Ramaekers, K., Duggan, K., Presser, L. D., Urbanska, L., ... Viegas, M. (2024). Standardized Phylogenetic Classification of Human Respiratory Syncytial Virus below the Subgroup Level. *Emerging Infectious Diseases*, 30(8), 1631–1641. <https://doi.org/10.3201/eid3008.240209>
- Goya, S., Sereewit, J., Pfalmer, D., Nguyen, T. V., Bakhash, S. A. K. M., Sobolik, E. B., & Greninger, A. L. (2023). Genomic characterization of respiratory syncytial virus during 2022–23 outbreak, Washington, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 29(4), 865.
- Graham, B. S. (2017). Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Current Opinion in Virology*, 23, 107–112.
- Griffin, M. P., Khan, A. A., Esser, M. T., Jensen, K., Takas, T., Kankam, M. K., Villafana, T., & Dubovsky, F. (2017). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI8897, the respiratory syncytial virus prefusion F-targeting monoclonal antibody with an extended half-life, in healthy adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01714-16>
- Griffin, M. P., Yuan, Y., Takas, T., Domachowske, J. B., Madhi, S. A., Manzoni, P., Simões, E. A. F., Esser, M. T., Khan, A. A., Dubovsky, F., Villafana, T., & DeVincenzo, J. P. (2020). Single-Dose Nirsevimab for Prevention of RSV in Preterm Infants. *New England Journal of Medicine*, 383(5), 415–425. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913556>
- Groen, K., Van Nieuwkoop, S., Lamers, M. M., Fouchier, R. A. M., & van den Hoogen, B. G. (2022). Evidence against the human metapneumovirus G, SH, and M2-2 proteins as bona fide interferon antagonists. *Journal of Virology*, 96(17), e00723-22.
- Groen, K., Van Nieuwkoop, S., Meijer, A., Van Der Veer, B., van Kampen, J. J. A., Fraaij, P. L., Fouchier, R. A. M., & Van Den Hoogen, B. G. (2023). Emergence and Potential Extinction of Genetic Lineages of Human Metapneumovirus between 2005 and 2021. *MBio*, 14(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02280-22>
- Group, Im.-R. S. (1998). Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*, 102(3), 531–537.
- Guo, L., Li, L., Liu, L., Zhang, T., & Sun, M. (2023). Neutralising antibodies against human metapneumovirus. In *The Lancet Microbe* (Vol. 4, Number 9, pp. e732–e744). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00134-9)
- Hacker, K., Kuan, G., Vydiswaran, N., Chowell-Puente, G., Patel, M., Sanchez, N., Lopez, R., Ojeda, S., Lopez, B., Mousa, J., Maier, H. E., Balmaseda, A., & Gordon, A. (2022). Pediatric burden and seasonality of human metapneumovirus over 5 years in Managua, Nicaragua. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(6), 1112–1121. <https://doi.org/10.1111/irv.13034>
- Hall, C. B., Weinberg, G. A., Iwane, M. K., Blumkin, A. K., Edwards, K. M., Staat, M. A., Auinger, P., Griffin, M. R., Poehling, K. A., & Erdman, D. (2009). The burden of

- respiratory syncytial virus infection in young children. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 588–598.
- Hanage, W. P., & Schaffner, W. (2025). Burden of Acute Respiratory Infections Caused by Influenza Virus, Respiratory Syncytial Virus, and SARS-CoV-2 with Consideration of Older Adults: A Narrative Review. In *Infectious Diseases and Therapy* (Vol. 14, Number Suppl 1, pp. 5–37). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40121-024-01080-4>
- Harkensee, C., Brodlie, M., Embleton, N. D., & Mckean, M. (2006). Passive immunisation of preterm infants with palivizumab against RSV infection. *Journal of Infection*, 52(1), 2–8.
- Hause, A. M., Henke, D. M., Avadhanula, V., Shaw, C. A., Tapia, L. I., & Piedra, P. A. (2017). Sequence variability of the respiratory syncytial virus (RSV) fusion gene among contemporary and historical genotypes of RSV/A and RSV/B. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175792>
- Heim, C. J., van den Hoogen, B. G., & Dutch, R. E. (2025). Human metapneumovirus: understanding the molecular mechanisms and pathology of infection. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00284-25>
- Herfst, S., de Graaf, M., Schickli, J. H., Tang, R. S., Kaur, J., Yang, C.-F., Spaete, R. R., Haller, A. A., van den Hoogen, B. G., & Osterhaus, A. D. M. E. (2004). Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *Journal of Virology*, 78(15), 8264–8270.
- Herfst, S., de Graaf, M., Schrauwen, E. J. A., Sprong, L., Hussain, K., van den Hoogen, B. G., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2008). Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters. *Journal of General Virology*, 89(7), 1553–1562.
- Huang, Q. S., Wood, T., Jelley, L., Jennings, T., Jefferies, S., Daniells, K., Nesdale, A., Dowell, T., Turner, N., & Campbell-Stokes, P. (2021). Impact of the COVID-19 nonpharmaceutical interventions on influenza and other respiratory viral infections in New Zealand. *Nature Communications*, 12(1), 1001.
- Huck, B., Scharf, G., Neumann-Haefelin, D., Puppe, W., Weigl, J., & Falcone, V. (2006). Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 147.
- Icosavax. (2023, February 21). *Icosavax Granted FDA Fast Track Designation for RSV & hMPV Vaccine Candidate*. <https://drug-dev.com/icosavax-granted-fda-fast-track-designation-for-rsv-hmpv-vaccine-candidate/>
- Iglesias-Caballero, M., Camarero-Serrano, S., Varona, S., Mas, V., Calvo, C., García, M. L., García-Costa, J., Vázquez-Morón, S., Monzón, S., Campoy, A., Cuesta, I., Pozo, F., & Casas, I. (2023). Genomic characterisation of respiratory syncytial virus: a novel system for whole genome sequencing and full-length G and F gene sequences. *Eurosurveillance*, 28(48). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.49.2300637>
- Jallow, M. M., Diagne, M. M., Sagne, S. N., Tall, F., Diouf, J. B. N., Boiro, D., Mendy, M. P., Ndiaye, N. K., Kiori, D., & Sy, S. (2023). Respiratory syncytial virus in pediatric patients with severe acute respiratory infections in Senegal: findings from the 2022 sentinel surveillance season. *Scientific Reports*, 13(1), 20404.
- Jesse, S. T., Ludlow, M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2022). Zoonotic origins of human metapneumovirus: a journey from birds to humans. *Viruses*, 14(4), 677.
- Jha, A., Jarvis, H., Fraser, C., & Openshaw, P. (2016). Respiratory syncytial virus. *SARS, MERS and Other Viral Lung Infections*.

- Jo, W. K., Schadenhofer, A., Habierski, A., Kaiser, F. K., Saletti, G., Ganzenmueller, T., Hage, E., Haid, S., Pietschmann, T., & Hansen, G. (2021). Reverse genetics systems for contemporary isolates of respiratory syncytial virus enable rapid evaluation of antibody escape mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14), e2026558118.
- Jobe, N. B., Rose, E., Winn, A. K., Goldstein, ; Leah, Schneider, Z. D., & Silk, B. J. (2025). *Morbidity and Mortality Weekly Report INSIDE 188 Epidemiology of Symptomatic Human Metapneumovirus Infection in the CASCADIA Human Metapneumovirus Seasonality and Co-Circulation with Respiratory Syncytial Virus-United States, 2014-2024*. https://www.cdc.gov/mmwr/mmwr_continuingEducation.html
- Jones, J. M. (2023). Use of nirsevimab for the prevention of respiratory syncytial virus disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2023. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72.
- Jorquera, P. A., Oakley, K. E., & Tripp, R. A. (2013). Advances in and the potential of vaccines for respiratory syncytial virus. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 7(4), 411–427.
- Kadjo, H. A., Khan, S. M., Tamim, S., Ar Gouilh, M., Adagba, M., Adjogoua, E., Coulibaly, D., Vabret, A., Cherry, J. L., Nelson, M. I., & Trovão, N. S. (2025). Repeated introductions and widespread transmission of human metapneumovirus in Côte d'Ivoire. *BMC Infectious Diseases*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11512-2>
- Kaler, J., Hussain, A., Patel, K., Hernandez, T., & Ray, S. (2023). Respiratory Syncytial Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathophysiology, and Manifestation. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.36342>
- Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589.
- Kamau, E., Oketch, J. W., De Laurent, Z. R., Phan, M. V. T., Agoti, C. N., Nokes, D. J., & Cotten, M. (2020). Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of human metapneumovirus strains from Kenya and Zambia. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6400-z>
- Karron, R. A., San Mateo, J., Wanionek, K., Collins, P. L., & Buchholz, U. J. (2018). Evaluation of a live attenuated human metapneumovirus vaccine in adults and children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 7(1), 86–89.
- 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>
- Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K., & Parrott, R. H. (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology*, 89(4), 422–434.
- Kinder, J. T. (2020). *Pneumovirus Infections: Understanding RSV and HMPV Entry, Replication, and Spread*.
- Kodani, M., Yang, G., Conklin, L. M., Travis, T. C., Whitney, C. G., Anderson, L. J., Schrag, S. J., Taylor, T. H., Beall, B. W., Breiman, R. F., Feikin, D. R., Njenga, M. K.,

- Mayer, L. W., Oberste, M. S., Tondella, M. L. C., Winchell, J. M., Lindstrom, S. L., Erdman, D. D., & Fields, B. S. (2011). Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2175–2182. <https://doi.org/10.1128/JCM.02270-10>
- Kong, W., Wang, Y., Zhu, H., Lin, X., Yu, B., Hu, Q., Yang, X., Guo, D., Peng, J., & Zhou, D. (2016). Circulation of human metapneumovirus among children with influenza-like illness in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 88(5), 774–781.
- Korsun, N., Angelova, S., Trifonova, I., Voleva, S., Grigorova, I., Tzotcheva, I., Mileva, S., Alexiev, I., & Perenovska, P. (2021). Predominance of ON1 and BA9 genotypes of respiratory syncytial virus (RSV) in Bulgaria, 2016-2018. *Journal of Medical Virology*, 93(6), 3401–3411.
- Korsun, N., Trifonova, I., Madzharova, I., Alexiev, I., Uzunova, I., Ivanov, I., Velikov, P., Tcherveniakova, T., & Christova, I. (2024). Resurgence of respiratory syncytial virus with dominance of RSV-B during the 2022–2023 season. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1376389>
- Kulkarni, D., Cong, B., Ranjini, M. J. K., Balchandani, G., Chen, S., Liang, J., González Gordon, L., Sobanjo-ter Meulen, A., Wang, X., Li, Y., Osei-Yeboah, R., Templeton, K., & Nair, H. (2025). The global burden of human metapneumovirus-associated acute respiratory infections in older adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Healthy Longevity*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.lanhl.2024.100679>
- Lamichhane, B., Minney-Smith, C. A., Gazeley, J., Wadia, U., Foley, D. A., Moore, H. C., Maticcevic, J., Smith, D. W., Effler, P., Blyth, C. C., Speers, D., & Levy, A. (2025). Respiratory Syncytial Virus Strain Evolution and Mutations in Western Australia in the Context of Nirsevimab Prophylaxis. *Open Forum Infectious Diseases*, 12(8). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaf429>
- Langedijk, A. C., Vrancken, B., Lebbink, R. J., Wilkins, D., Kelly, E. J., Baraldi, E., Mascareñas de Los Santos, A. H., Danilenko, D. M., Choi, E. H., Palomino, M. A., Chi, H., Keller, C., Cohen, R., Papenburg, J., Pernica, J., Greenough, A., Richmond, P., Martínón-Torres, F., Heikkinen, T., ... Bont, L. J. (2024). The genomic evolutionary dynamics and global circulation patterns of respiratory syncytial virus. *Nature Communications*, 15(1), 3083. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47118-6>
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Laudanno, S. L., Yanotti, C. I. S., & Polack, F. P. (2020). RSV lower respiratory tract illness in infants of low-and middle-income countries. *Acta Medica Academica*, 49(2).
- Lee, C. Y., Wu, T. H., Fang, Y. P., Chang, J. C., Wang, H. C., Lin, S. J., Huang, Y. R., & Chang, Y. C. (2025). Clinical features and genomic characteristics of post-pandemic human metapneumovirus infections in hospitalized Taiwanese children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2025.05.002>
- Levine, S. (1977). Polypeptides of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 21(1), 427–431.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100.
- Li, P., Rixon, H. W. M., Brown, G., & Sugrue, R. J. (2007). Functional analysis of the N-linked glycans within the fusion protein of respiratory syncytial virus. *Glycoviropology Protocols*, 69–83.

- Li, Y., Wang, X., Blau, D. M., Caballero, M. T., Feikin, D. R., Gill, C. J., Madhi, S. A., Omer, S. B., Simões, E. A. F., Campbell, H., Pariente, A. B., Bardach, D., Bassat, Q., Casalegno, J. S., Chakhunashvili, G., Crawford, N., Danilenko, D., Do, L. A. H., Echavarria, M., ... Nair, H. (2022). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10340), 2047–2064. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00478-0)
- Lianou, A., Tsantes, A. G., Ioannou, P., Bikouli, E. D., Batsiou, A., Kokkinou, A., Tsante, K. A., Tsilidis, D., Lampridou, M., Iacovidou, N., & Sokou, R. (2025). hMPV Outbreaks: Worldwide Implications of a Re-Emerging Respiratory Pathogen. In *Microorganisms* (Vol. 13, Number 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071508>
- Liljeroos, L., Krzyzaniak, M. A., Helenius, A., & Butcher, S. J. (2013). Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11133–11138.
- Lu, B., Ma, C.-H., Brazas, R., & Jin, H. (2002). The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. *Journal of Virology*, 76(21), 10776–10784.
- Madan, V., Redondo, N., & Carrasco, L. (2010). Cell permeabilization by poliovirus 2B viroporin triggers bystander permeabilization in neighbouring cells through a mechanism involving gap junctions. *Cellular Microbiology*, 12(8), 1144–1157.
- Martínez, I., Dopazo, J., & Melero, J. A. (1997). Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *Journal of General Virology*, 78(10), 2419–2429.
- Martínez, I., Valdés, O., Delfraro, A., Arbiza, J., Russi, J., & Melero, J. A. (1999). Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *Journal of General Virology*, 80(1), 125–130.
- Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magné, R., Gomard, E., Guillet, J., Lévy, J., & Meulien, P. (1993). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European Journal of Immunology*, 23(7), 1719–1722.
- Mas, V., Nair, H., Campbell, H., Melero, J. A., & Williams, T. C. (2018). Antigenic and sequence variability of the human respiratory syncytial virus F glycoprotein compared to related viruses in a comprehensive dataset. *Vaccine*, 36(45), 6660–6673. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.09.056>
- Masante, C., El Najjar, F., Chang, A., Jones, A., Moncman, C. L., & Dutch, R. E. (2014). The Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Has Properties Consistent with Those of a Viroporin and Can Modulate Viral Fusogenic Activity. *Journal of Virology*, 88(11), 6423–6433. <https://doi.org/10.1128/jvi.02848-13>
- Mazela, J., Jackowska, T., Czech, M., Helwich, E., Martyn, O., Aleksiejuk, P., Smaga, A., Glazewska, J., & Wysocki, J. (2024). Epidemiology of respiratory syncytial virus hospitalizations in Poland: An analysis from 2015 to 2023 covering the entire polish population of children aged under five years. *Viruses*, 16(5), 704.
- McGinley, J. P., Lin, G. L., Öner, D., Golubchik, T., O’connor, D., Snape, M. D., Gruselle, O., Langedijk, A. C., Wildenbeest, J., & Openshaw, P. (2022). Clinical and viral factors associated with disease severity and subsequent wheezing in infants with

- respiratory syncytial virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(Supplement_1), S45–S54.
- McLellan, J. S., Chen, M., Joyce, M. G., Sastry, M., Stewart-Jones, G. B. E., Yang, Y., Zhang, B., Chen, L., Srivatsan, S., & Zheng, A. (2013). Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*, 342(6158), 592–598.
- McLellan, J. S., Chen, M., Leung, S., Graepel, K. W., Du, X., Yang, Y., Zhou, T., Baxa, U., Yasuda, E., Beaumont, T., Kumar, A., Modjarrad, K., Zheng, Z., Zhao, M., Xia, N., Kwong, P. D., & Graham, B. S. (2013). Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*, 340(6136), 1113–1117. <https://doi.org/10.1126/science.1234914>
- McLellan, J. S., Ray, W. C., & Peeples, M. E. (2013). Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 372, 83–104. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4
- McLellan, J. S., Yang, Y., Graham, B. S., & Kwong, P. D. (2011). Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*, 85(15), 7788–7796. <https://doi.org/10.1128/jvi.00555-11>
- Mejías, A., Chávez-Bueno, S., Ríos, A. M., Aten, M. F., Raynor, B., Peromingo, E., Soni, P., Olsen, K. D., Kiener, P. A., & Gómez, A. M. (2005). Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4700–4707.
- Miller, R. J., & Mousa, J. J. (2023). Structural basis for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus neutralization. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 61). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101337>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (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>
- MINSA. (2025, May 27). *Llega a Panamá la vacuna contra el Virus Sincitial Respiratorio*. <https://www.minsa.gob.pa/noticia/llega-panama-la-vacuna-contra-el-virus-sincitial-respiratorio>
- MINSA, P. (2017). *Normas y Procedimientos - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Síndrome Gripal o Gripe o Influenza Y de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves*. https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/norma_nacional_de_vigilancia_virus_respiratorios.pdf
- Mitra, R., Baviskar, P., Duncan-Decocq, R. R., Patel, D., & Oomens, A. G. P. (2012). The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *Journal of Virology*, 86(8), 4432–4443.
- Moe, N., Krokstad, S., Stenseng, I. H., Christensen, A., Skanke, L. H., Risnes, K. R., Nordbo, S. A., & Dollner, H. (2017). Comparing human metapneumovirus and respiratory syncytial virus: Viral codetections, genotypes and risk factors for severe disease. *PLoS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170200>
- Mohammadi, K., Faramarzi, S., Yaribash, S., Valizadeh, Z., Rajabi, E., Ghavam, M., Samiee, R., Karim, B., Salehi, M., Seifi, A., & Shafaati, M. (2025). Human

- metapneumovirus (hMPV) in 2025: emerging trends and insights from community and hospital-based respiratory panel analyses—a comprehensive review. In *Virology Journal* (Vol. 22, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02782-y>
- Morris, J. A., Blount Jr, R. E., & Savage, R. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(3), 544–549.
- Mufson, M. A., Örvell, C., Rafnar, B., & Norrby, E. (1985). Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, 66(10), 2111–2124.
- Nao, N., Saikusa, M., Sato, K., Sekizuka, T., Usuku, S., Tanaka, N., Nishimura, H., & Takeda, M. (2020a). Recent molecular evolution of human metapneumovirus (HMPV): subdivision of HMPV A2b strains. *Microorganisms*, 8(9), 1280.
- Nao, N., Saikusa, M., Sato, K., Sekizuka, T., Usuku, S., Tanaka, N., Nishimura, H., & Takeda, M. (2020b). Recent molecular evolution of human metapneumovirus (HMPV): Subdivision of HMPV a2b strains. *Microorganisms*, 8(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091280>
- Narro Flores, M. E., Copado, J. L., & Hernández Porras, M. (2025). Metapneumovirus humano. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 38(1), 3–4. <https://doi.org/10.35366/120265>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nidaira, M., Taira, K., Hamabata, H., Kawaki, T., Gushi, K., Mahoe, Y., Maeshiro, N., Azama, Y., Okano, S., & Kyan, H. (2012). Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65(4), 337–340.
- Nieva, J. L., Madan, V., & Carrasco, L. (2012). Viroporins: structure and biological functions. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 563–574.
- Nikiforow, S., Horowitz, M., McCarty, J. M., Abbas, A., Coghill, J., Stanton, J., Ma, J., Vasileiou, S., Gilmore, S., & Dholaria, B. (2024). ALVR106, an Off-the-Shelf, Multivirus-Specific T-Cell Therapy, for the Treatment of Respiratory Viral Infections: Results from a Phase 1, First-in-Human, Dose-Ranging Trial. *Transplantation and Cellular Therapy, Official Publication of the American Society for Transplantation and Cellular Therapy*, 30(2), S83–S84.
- O’Brien, K. L., Chandran, A., Weatherholtz, R., Jafri, H. S., Griffin, M. P., Bellamy, T., Millar, E. V, Jensen, K. M., Harris, B. S., & Reid, R. (2015). Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(12), 1398–1408.
- Ogonczyk Makowska, D., Hamelin, M.-È., & Boivin, G. (2020). Engineering of live chimeric vaccines against human metapneumovirus. *Pathogens*, 9(2), 135.
- Ohmit, S. E., Moler, F. W., Monto, A. S., & Khan, A. S. (1996). Ribavirin utilization and clinical effectiveness in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *Journal of Clinical Epidemiology*, 49(9), 963–967.
- Okabe, H., Hashimoto, K., Norito, S., Asano, Y., Sato, M., Kume, Y., Chishiki, M., Maeda, H., Mashiyama, F., & Takeyama, A. (2025). Amino acid substitutions in the fusion

- protein of respiratory syncytial virus in Fukushima, Japan, during 2008–2023 and their effects. *The Journal of Infectious Diseases*, 231(6), 1544–1552.
- Oliveira, D. B. L., Iwane, M. K., Prill, M. M., Weinberg, G. A., Williams, J. V., Griffin, M. R., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Hall, C. B., Durigon, E. L., & Erdman, D. D. (2015). Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. *Journal of Clinical Virology*, 65, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.016>
- Olmsted, R. A., & Collins, P. L. (1989). The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *Journal of Virology*, 63(5), 2019–2029.
- Pan, J., Qian, X., Lattmann, S., El Sahili, A., Yeo, T. H., Jia, H., Cressey, T., Ludeke, B., Noton, S., & Kalocsay, M. (2020). Structure of the human metapneumovirus polymerase phosphoprotein complex. *Nature*, 577(7789), 275–279.
- Panda, S., Mohakud, N. K., Pena, L., & Kumar, S. (2014). Human metapneumovirus: Review of an important respiratory pathogen. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 25, pp. 45–52). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1394>
- Papenburg, J., Hamelin, M.-È., Ouhoumane, N., Carbonneau, J., Ouakki, M., Raymond, F., Robitaille, L., Corbeil, J., Caouette, G., & Frenette, L. (2012). Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(2), 178–189.
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279.
- PATH. (2025). *RSV vaccine and mAb snapshot* | PATH. <https://www.path.org/our-impact/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>
- Peret, T. C. T., Hall, C. B., Schnabel, K. C., Golub, J. A., & Anderson, L. J. (1998). Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology*, 79(9), 2221–2229.
- Pham, Q. N., Biacchesi, S., Skiadopoulou, M. H., Murphy, B. R., Collins, P. L., & Buchholz, U. J. (2005). Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *Journal of Virology*, 79(24), 15114–15122.
- Pierangeli, A., Nenna, R., Fracella, M., Scagnolari, C., Oliveto, G., Sorrentino, L., Frasca, F., Conti, M. G., Petrarca, L., Papoff, P., Turriziani, O., Antonelli, G., Stefanelli, P., Palamara, A. T., & Midulla, F. (2023). Genetic diversity and its impact on disease severity in respiratory syncytial virus subtype-A and -B bronchiolitis before and after pandemic restrictions in Rome. *Journal of Infection*, 87(4), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.07.008>
- Piñana, M., González-Sánchez, A., Andrés, C., Abanto, M., Vila, J., Esperalba, J., Moral, N., Espartosa, E., Saubi, N., Creus, A., Codina, M. G., Folgueira, D., Martínez-Urtaza, J., Pumarola, T., & Antón, A. (2023). The emergence, impact, and evolution of human metapneumovirus variants from 2014 to 2021 in Spain. *Journal of Infection*, 87(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.05.004>
- Piñana, M., Vila, J., Gimferrer, L., Valls, M., Andrés, C., Codina, M. G., Ramón, J., Martín, M. C., Fuentes, F., Saiz, R., Alcubilla, P., Rodrigo, C., Pumarola, T., & Antón,

- A. (2017). Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene. *Future Microbiology*, 12(7), 565–571. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0211>
- Pless, L. L., Damodaran, L., Pomponio, R., Patrick, R., Griffith, M. P., Walters, S., Waggle, K. D., Pleskovitch, A., Rangachar Srinivasa, V., & Varela, C. A. (2025). Emergence and Epidemiology of Dominant Variants of Human Metapneumovirus in the United States between 2016 and 2021. *MedRxiv*, 2025–2028.
- Pollett, S., Trovão, N. S., Tan, Y., Eden, J. S., Halpin, R. A., Bera, J., Das, S. R., Wentworth, D., Ocaña, V., Mendocilla, S. M., Álvarez, C., Calisto, M. E., Garcia, J., Halsey, E., Ampuero, J. S., Nelson, M. I., & Leguia, M. (2018). The transmission dynamics and diversity of human metapneumovirus in Peru. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12(4), 508–513. <https://doi.org/10.1111/irv.12537>
- Principi, N., Fainardi, V., & Esposito, S. (2025). Human Metapneumovirus: A Narrative Review on Emerging Strategies for Prevention and Treatment. In *Viruses* (Vol. 17, Number 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v17081140>
- Qing, Z., S, M. J., L, K. N., D, U. N., Susan, P., Jing, Z., Brian, M., Anis, K., Catherine, S., M, M. J., Daniel, W., K, P. N., E, C. K., M, R. B. W., C, R. P., Q, Y. A., & A, S. J. (2017). A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. *Science Translational Medicine*, 9(388), eaaj1928. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1928>
- Quiroz R, E., Gómez, B., Peralta, P. H., & Reeves, W. C. (1987). Actividad del virus influenza en la región metropolitana de la ciudad de Panamá, 1976-1986. *Rev. Méd. Panamá*, 189–194.
- Rahombanjanahary, N. H. R., Rybkina, K., Randriambolamanantsoa, T. H., Razafimanjato, H., & Heraud, J.-M. (2020). Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus circulated in Antananarivo, Madagascar, from 2011 to 2017: Predominance of ON1 and BA9 genotypes. *Journal of Clinical Virology*, 129, 104506.
- Ralston, S. L., Lieberthal, A. S., Meissner, H. C., Alverson, B. K., Baley, J. E., Gadomski, A. M., Johnson, D. W., Light, M. J., Maraqa, N. F., & Mendonca, E. A. (2014). Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics*, 134(5), e1474–e1502.
- Ramaekers, K., Rector, A., Cuypers, L., Lemey, P., Keyaerts, E., & van Ranst, M. (2020). Towards a unified classification for human respiratory syncytial virus genotypes. *Virus Evolution*, 6(2). <https://doi.org/10.1093/ve/veaa052>
- Rappazzo, C. G., Hsieh, C.-L., Rush, S. A., Esterman, E. S., Delgado, T., Geoghegan, J. C., Wec, A. Z., Sakharkar, M., Mas, V., & McLellan, J. S. (2022). Potently neutralizing and protective anti-human metapneumovirus antibodies target diverse sites on the fusion glycoprotein. *Immunity*, 55(9), 1710–1724.
- Redlberger-Fritz, M., Springer, D. N., Aberle, S. W., Camp, J. V., & Aberle, J. H. (2023). Respiratory syncytial virus surge in 2022 caused by lineages already present before the COVID-19 pandemic. *Journal of Medical Virology*, 95(6). <https://doi.org/10.1002/jmv.28830>
- Reiche, J., Jacobsen, S., Neubauer, K., Hafemann, S., Nitsche, A., Milde, J., Wolff, T., & Schweiger, B. (2014). Human metapneumovirus: insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PloS One*, 9(2), e88342.

- Reimers, K., Buchholz, K., & Werchau, H. (2005). Respiratory syncytial virus M2-1 protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *Virology*, 331(2), 260–268.
- Renner, M., Bertinelli, M., Leyrat, C., Paesen, G. C., Saraiva de Oliveira, L. F., Huiskonen, J. T., & Grimes, J. M. (2016). Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *Elife*, 5, e12627.
- Rezende, W., Neal, H. E., Dutch, R. E., & Piedra, P. A. (2023). The RSV F p27 peptide: Current knowledge, important questions. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1219846.
- Ribó-Molina, P., Groen, K., Susma, B., Van Nieuwkoop, S., Funk, M., Fouchier, R. A. M., & Van Den Hoogen, B. G. (2025). The role of M2 proteins of pneumoviruses in transcription regulation, prevention of hypermutation, and activation of the type I interferon pathway. *Journal of Virology*, 99(2), e01243-24.
- 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., ... Hare, D. (2025). Human respiratory syncytial virus genetic diversity and lineage replacement in Ireland pre- and post-COVID-19 pandemic. *Microbial Genomics*, 11(3).
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.001379>
- Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R. A., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., Wang, L., & Consortium, I. R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *Journal of General Virology*, 98(12), 2912–2913.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000959>
- Roberts, S. R., Lichtenstein, D., Ball, L. A., & Wertz, G. W. (1994). The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *Journal of Virology*, 68(7), 4538–4546.
- Rodriguez, P. E., Frutos, M. C., Adamo, M. P., Cuffini, C., Cámara, J. A., Paglini, M. G., Moreno, L., & Cámara, A. (2020). Human Metapneumovirus: Epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PLoS ONE*, 15(12 December).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244093>
- Russell, C. J., Simoes, E. A. F., & Hurwitz, J. L. (2018). Vaccines for the paramyxoviruses and pneumoviruses: successes, candidates, and hurdles. *Viral Immunology*, 31(2), 133–141.
- Sáez-Llorens, X., Castillo, C. L., Franco, D., Esquivel, R., Luciani, K., & DeAntonio, R. (2025). Immunization strategies against respiratory syncytial virus in Panama: considerations for decision-making in a tropical country—a working group meeting report. *Frontiers in Public Health*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1547875>
- Saikusa, M., Nao, N., Kawakami, C., Usuku, S., Sasao, T., Toyozawa, T., Takeda, M., & Okubo, I. (2017). A novel 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus. *Microbiology and Immunology*, 61(11), 507–512.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12543>
- Sanofi. (2025, June 15). *Study of a Human Metapneumovirus/Respiratory Syncytial Virus mRNA Vaccine Candidate Encapsulated in a Lipid Nanoparticle-Based Formulation in Adults Aged 60 Years and Older*.
<https://www.sanofistudies.com/us/en/listing/312997/study-of-a-human/#original>

- Satake, M., Coligan, J. E., Elango, N., Norrby, E., & Venkatesan, S. (1985). Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Research*, 13(21), 7795–7812.
- Satapathy, T., Satapathy, A., Satapathy, A., Yadav, N., Chandrakar, M., & Chandrakar, K. (2025). Recent outbreaks of Human Metapneumovirus (HMPV): Prevention, Diagnosis and Therapeutic insights. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 15(2).
- Schnyder Ghamloush, S., Essink, B., Hu, B., Kalidindi, S., Morsy, L., Egwuenu-Dumbuya, C., Kapoor, A., Girard, B., Dhar, R., & Lackey, R. (2024). Safety and immunogenicity of an mRNA-based hMPV/PIV3 combination vaccine in seropositive children. *Pediatrics*, 153(6), e2023064748.
- Schowalter, R. M., Smith, S. E., & Dutch, R. E. (2006). Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *Journal of Virology*, 80(22), 10931–10941.
- Schuster, J. E., Cox, R. G., Hastings, A. K., Boyd, K. L., Wadia, J., Chen, Z., Burton, D. R., Williamson, R. A., & Williams, J. V. (2015). A broadly neutralizing human monoclonal antibody exhibits in vivo efficacy against both human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 211(2), 216–225.
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134.
- Sevendal, A. T. K., Hurley, S., Bartlett, A. W., Rawlinson, W., & Walker, G. J. (2024). Systematic Review of the Efficacy and Safety of RSV-Specific Monoclonal Antibodies and Antivirals in Development. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 34, Number 5). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.2576>
- Shachor-Meyouhas, Y., Ben-Barak, A., & Kassiss, I. (2011). Treatment with oral ribavirin and IVIG of severe human metapneumovirus pneumonia (HMPV) in immune compromised child. *Pediatric Blood & Cancer*, 57(2), 350–351.
- Shapiro, C., Sánchez-Crespo, N., Ciarlet, M., Hourguettes, N., Wen, J., Rida, W., Price, J., Engram, A. E., Adams, E. M., & Kanesa-Thanan, N. (2025). A Randomized Phase 1 Clinical Trial of a Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Combination Protein-Based Virus-like Particle Vaccine in Adults 60–75 Years of Age. *Open Forum Infectious Diseases*, 12(4), ofaf160.
- Sharipova, E. V., Babachenko, I. V., & Orlova, E. D. (2020). Metapneumovirus infection in children. *Pediatrician (St. Petersburg)*, 11(5), 13–19. <https://doi.org/10.17816/ped11513-19>
- Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., Gessner, B. D., Polack, F. P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., Alassani, I., Ali, A., Antonio, M., Awasthi, S., Awori, J. O., Azziz-Baumgartner, E., Baggett, H. C., Baillie, V. L., Balmaseda, A., ... Network, R. S. V. G. E. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)*, 390(10098), 946–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
- Shi, T., Vennard, S., Jasiewicz, F., Brogden, R., & Nair, H. (2022). Disease burden estimates of respiratory syncytial virus related acute respiratory infections in adults with comorbidity: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(Supplement_1), S17–S21.

- Shu, B., Kirby, M. K., Davis, W. G., Warnes, C., Liddell, J., Liu, J., Wu, K. H., Hassell, N., Benitez, A. J., Wilson, M. M., Keller, M. W., Rambo-Martin, B. L., Camara, Y., Winter, J., Kondor, R. J., Zhou, B., Spies, S., Rose, L. E., Winchell, J. M., ... Barnes, J. R. (2021). Multiplex real-time reverse transcription PCR for influenza a virus, influenza b virus, and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7), 1821–1830. <https://doi.org/10.3201/eid2707.210462>
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., & Committee, H. C. I. C. P. A. (2007). 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 35(10), S65.
- Simoes, E. A. F. (2003). Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *The Journal of Pediatrics*, 143(5, Supplement), 118–126. [https://doi.org/https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00511-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00511-0)
- Simões, E. A. F., Forleo-Neto, E., Geba, G. P., Kamal, M., Yang, F., Cicirello, H., Houghton, M. R., Rideman, R., Zhao, Q., & Benvin, S. L. (2021). Suptavumab for the prevention of medically attended respiratory syncytial virus infection in preterm infants. *Clinical Infectious Diseases*, 73(11), e4400–e4408.
- Stein, M., Cohen, H., Nemet, I., Atari, N., Kliker, L., Fratty, I. S., Bucris, E., Geva, M., Mendelson, E., Zuckerman, N., & Mandelboim, M. (2022). Human metapneumovirus prevalence during 2019-2021 in Israel is influenced by the COVID-19 pandemic. *International Journal of Infectious Diseases*, 120, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.037>
- Streng, A., Goettler, D., Haerlein, M., Lehmann, L., Ulrich, K., Prifert, C., Krempel, C., Weißbrich, B., & Liese, J. G. (2019). Spread and clinical severity of respiratory syncytial virus A genotype ON1 in Germany, 2011–2017. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 613.
- Sun, B. W., Zhang, P. P., Wang, Z. H., Yao, X., He, M. L., Bai, R. T., Che, H., Lin, J., Xie, T., Hui, Z., Ye, X. Y., & Wang, L. W. (2024). Prevention and Potential Treatment Strategies for Respiratory Syncytial Virus. In *Molecules* (Vol. 29, Number 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules29030598>
- Tabor, D. E., Fernandes, F., Langedijk, A. C., Wilkins, D., Lebbink, R. J., Tovchigrechko, A., Ruzin, A., Kragten-Tabatabaie, L., Jin, H., & Esser, M. T. (2020). Global molecular epidemiology of respiratory syncytial virus from the 2017– 2018 INFORM-RSV Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(1), e01828-20.
- Tang, A., Chen, Z., Cox, K. S., Su, H. P., Callahan, C., Fridman, A., Zhang, L., Patel, S. B., Cejas, P. J., Swoyer, R., Touch, S., Citron, M. P., Govindarajan, D., Luo, B., Eddins, M., Reid, J. C., Soisson, S. M., Galli, J., Wang, D., ... Vora, K. A. (2019). A potent broadly neutralizing human RSV antibody targets conserved site IV of the fusion glycoprotein. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12137-1>
- Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M., & Abbasi, B. H. (2022). Virus-like particles: revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, 12, 790121.
- Thompson, R. E., Edmonds, K., & Dutch, R. E. (2023). Specific residues in the C-terminal domain of the human metapneumovirus phosphoprotein are indispensable for

- formation of viral replication centers and regulation of the function of the viral polymerase complex. *Journal of Virology*, 97(5), e00030-23.
- Thornhill, E. M., & Verhoeven, D. (2020). Respiratory syncytial virus's non-structural proteins: masters of interference. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 225.
- Tramuto, F., Maida, C. M., Randazzo, G., Guzzetta, V., Santino, A., Li Muli, R., Costantino, C., Graziano, G., Amodio, E., Mazzucco, W., & Vitale, F. (2024). Whole-Genome Sequencing and Genetic Diversity of Human Respiratory Syncytial Virus in Patients with Influenza-like Illness in Sicily (Italy) from 2017 to 2023. *Viruses*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/v16060851>
- Tran, T.-L., Castagné, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M., Henry, C., Bernard, J., Yeo, R. P., & Eléouët, J.-F. (2009). The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *Journal of Virology*, 83(13), 6363–6374.
- Trento, A., Ábrego, L., Rodríguez-Fernandez, R., González-Sánchez, M. I., González-Martínez, F., Delfraro, A., Pascale, J. M., Arbiza, J., & Melero, J. A. (2015). Conservation of G-protein epitopes in respiratory syncytial virus (group A) despite broad genetic diversity: is antibody selection involved in virus evolution? *Journal of Virology*, 89(15), 7776–7785.
- Trento, A., Galiano, M., Videla, C., Carballal, G., García-Barreno, B., Melero, J. A., & Palomo, C. (2003). Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *Journal of General Virology*, 84(11), 3115–3120.
- Tripp, R. A., Jones, L. P., Haynes, L. M., Zheng, H., Murphy, P. M., & Anderson, L. J. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature Immunology*, 2(8), 732–738.
- Ujiie, M., Tsuzuki, S., Nakamoto, T., Iwamoto, N., & Ujiie, M. (2021). Resurgence of respiratory syncytial virus infections during covid-19 pandemic, tokyo, japan. *Emerging Infectious Diseases*, 27(11), 2969–2970. <https://doi.org/10.3201/eid2711.211565>
- van den Hoogen, B. G., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2002). Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, 295(1), 119–132.
- van den Hoogen, B. G., de Jong, J. C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., & Fouchier, R. A. M. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine*, 7(6), 719–724. <https://doi.org/10.1038/89098>
- Van den Hoogen, B. G., Herfst, S., Sprong, L., Cane, P. A., Forleo-Neto, E., De Swart, R. L., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2004). Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 10(4), 658.
- Van Royen, T., Rossey, I., Sedeyn, K., Schepens, B., & Saelens, X. (2022). How RSV proteins join forces to overcome the host innate immune response. *Viruses*, 14(2), 419.
- Vartak, A., & Suchek, S. J. (2016). Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 12.
- Vaxxel. (2024). *Preclinical In Vivo Efficacy Results on Vaxxel's Intranasal Vaccine Candidate Against Pneumovirus Infections Confirmed Through Study Funded by*

- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. <https://lyonbiopole.com/wp-content/uploads/2024/10/Vaxxell-PR-NIAID-20241001-EN-VDEF1.pdf>
- Velayutham, T. S., Ivanciuc, T., Garofalo, R. P., & Casola, A. (2022). Role of human metapneumovirus glycoprotein G in modulation of immune responses. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962925>
- Vidal, L. R. R., Pereira, L. A., Debur, M. C., Raboni, S. M., Nogueira, M. B., Cavalli, B., & Almeida, S. M. (2019). The influence of temperature and rainfall in the human viral infections. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*, 1(1), 12–20.
- Viegas, M., Goya, S., & Mistchenko, A. S. (2016). Sixteen years of evolution of human respiratory syncytial virus subgroup A in Buenos Aires, Argentina: GA2 the prevalent genotype through the years. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.034>
- Wang, X., Li, Y., Deloria-Knoll, M., Madhi, S. A., Cohen, C., Ali, A., Basnet, S., Bassat, Q., Brooks, W. A., Chittaganpitch, M., Echavarria, M., Fasce, R. A., Goswami, D., Hirve, S., Homaira, N., Howie, S. R. C., Kotloff, K. L., Khuri-Bulos, N., Krishnan, A., ... Morpeth, S. (2021). Global burden of acute lower respiratory infection associated with human metapneumovirus in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. *The Lancet Global Health*, 9(1), e33–e43. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30393-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30393-4)
- Wang, X., Stelzer-Braid, S., Scotch, M., & Rawlinson, W. D. (2022). Detection of respiratory viruses directly from clinical samples using next-generation sequencing: A literature review of recent advances and potential for routine clinical use. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 32, Number 5). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.2375>
- Weber, M. W., Mulholland, E. K., & Greenwood, B. M. (1998). Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Tropical Medicine and International Health*, 3(4), 268–280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00213.x>
- Wen, S. C., & Williams, J. V. (2015). New approaches for immunization and therapy against human metapneumovirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(8), 858–866.
- Wen, X., Krause, J. C., Leser, G. P., Cox, R. G., Lamb, R. A., Williams, J. V., Crowe Jr, J. E., & Jardetzky, T. S. (2012). Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4), 461–463.
- Wertz, G. W., Collins, P. L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S., & Ball, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4075–4079.
- Wetzke, M., Le, D. B., Tometten, I., Ritter, S., Lübke, N., Timm, J., Dilthey, A., Panning, M., Walker, A., & Happle, C. (2025). Prevalence of Resistance-Associated Mutations in RSV F Protein Against Monoclonal Antibodies Prior to Widespread Implementation: Findings From a Prospective German Pediatric Cohort. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 19(9). <https://doi.org/10.1111/irv.70164>
- Wijesundara, D. K., Avumegah, M. S., Lackenby, J., Modhiran, N., Isaacs, A., Young, P. R., Watterson, D., & Chappell, K. J. (2020). Rapid response subunit vaccine design in the absence of structural information. *Frontiers in Immunology*, 11, 592370.
- Wilkins, D., Langedijk, A. C., Lebbink, R. J., Morehouse, C., Abram, M. E., Ahani, B., Aksyuk, A. A., Baraldi, E., Brady, T., Chen, A. T., Chi, H., Choi, E. H., Cohen, R.,

- Danilenko, D. M., Gopalakrishnan, V., Greenough, A., Heikkinen, T., Hosoya, M., Keller, C., ... Yun, K. W. (2023). Nirsevimab binding-site conservation in respiratory syncytial virus fusion glycoprotein worldwide between 1956 and 2021: an analysis of observational study sequencing data. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(7), 856–866. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00062-2)
- Williams, J. V., Crowe Jr, J. E., Enriquez, R., Minton, P., Peebles Jr, R. S., Hamilton, R. G., Higgins, S., Griffin, M., & Hartert, T. V. (2005). Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(7), 1149–1153.
- Wu, S.-J., Schmidt, A., Beil, E. J., Day, N. D., Branigan, P. J., Liu, C., Gutshall, L. L., Palomo, C., Furze, J., & Taylor, G. (2007). Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. *Journal of General Virology*, 88(10), 2719–2723.
- Xiao, X., Fridman, A., Zhang, L., Pristatsky, P., Durr, E., Minnier, M., Tang, A., Cox, K. S., Wen, Z., & Moore, R. (2022). Profiling of hMPV F-specific antibodies isolated from human memory B cells. *Nature Communications*, 13(1), 2546.
- Yamin, D., Jones, F. K., DeVincenzo, J. P., Gertler, S., Kobiler, O., Townsend, J. P., & Galvani, A. P. (2016). Vaccination strategies against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13239–13244.
- Yang, C.-F., Wang, C. K., Tollefson, S. J., Piyaatna, R., Lintao, L. D., Chu, M., Liem, A., Mark, M., Spaete, R. R., & Crowe, J. E. (2009). Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virology Journal*, 6(1), 1–10.
- Yu, J., Liu, C., Xiao, Y., Xiang, Z., Zhou, H., Chen, L., Shen, K., Xie, Z., Ren, L., & Wang, J. (2019). Respiratory syncytial virus seasonality, Beijing, China, 2007–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1127–1135. <https://doi.org/10.3201/eid2506.180532>
- Yunker, M., Fall, A., Norton, J. M., Abdullah, O., Villafuerte, D. A., Pekosz, A., Klein, E., & Mostafa, H. H. (2024). Genomic Evolution and Surveillance of Respiratory Syncytial Virus during the 2023–2024 Season. *Viruses*, 16(7), 1122. <https://doi.org/10.3390/v16071122>
- Zhang, C., Xiao, Y., Du, J., Ren, L., Wang, J., Peng, J., & Jin, Q. (2015). Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2549–2554.
- Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N., & Kim, P. S. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14172–14177.
- Zheng, Z., Pitzer, V. E., Warren, J. L., & Weinberger, D. M. (2021). Community factors associated with local epidemic timing of respiratory syncytial virus: a spatiotemporal modeling study. *Science Advances*, 7(26), eabd6421.
- Zhu, Q., McLellan, J. S., Kallewaard, N. L., Ulbrandt, N. D., Palaszynski, S., Zhang, J., Moldt, B., Khan, A., Svabek, C., & McAuliffe, J. M. (2017). A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. *Sci Transl Med* 9: eaaj1928.
- Zhu, Q., Patel, N. K., McAuliffe, J. M., Zhu, W., Wachter, L., McCarthy, M. P., & Suzich, J. A. (2012). Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion

protein of respiratory syncytial virus (RSV): effects on RSV susceptibility to palivizumab. *Journal of Infectious Diseases*, 205(4), 635–638.

Zimmer, G., Trotz, I. N. A., & Herrler, G. (2001). N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 75(10), 4744–4751.

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
ESTADO DEL ARTE DEL RSVh Y MPVh	
:	
Figura 1. Morfología de la familia <i>Pneumoviridae</i>	15
Figura 2. Organización genómica comparada y representación estructural del VSRh y del MPVh	16
Figura 3. Organización estructural y representación tridimensional de la glicoproteína G del VSRh	20
Figura 4. Organización estructural y sitios antigénicos de la glicoproteína F de los pneumovirus	25
Figura 5. Arquitectura estructural del pentámero de la proteína SH del VSRh	27
Figura 6. Organización estructural de la nucleoproteína (N) y del complejo N-ARN en <i>Pneumovirus</i>	29
Figura 7. Organización del tetrámero de la proteína P del VSRh y su interacción con la polimerasa L	31
Figura 8. Organización estructural de la ARN-polimerasa L de VSRh en complejo con la fosfoproteína P	32
Figura 9. Organización estructural de la proteína M2-1 en <i>Pneumoviridae</i>	34
Figura 10. Estructura dimérica de la proteína M en <i>Pneumoviridae</i>	35
Figura 11. Estacionalidad del VSRh en las Américas	41
Figura 12. Hallazgos radiológicos en bronquiolitis severa por VSRh	44
CAPÍTULO I:	
DINÁMICA EVOLUTIVA Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VSRh EN PANAMÁ (2006–2024): CLASIFICACIÓN FILOGENÓMICA Y EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN ANTIGÉNICA FRENTE A ANTICUERPOS ANTI-F	
Figura 13. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de ETI e IRAG en Panamá	71
Figura 14. Tendencias anuales de casos reportados de VSRh y de otros virus respiratorios en Panamá	80
Figura 15. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de los genomas completos de VSRh-A y VSRh-B	83

<i>Figura 16.</i> Ensayos de aislamiento, visualización y titulación viral de VSRh	86
<i>Figura 17.</i> Curvas de neutralización obtenidas mediante el ensayo FRNT	87
<i>Figura 18.</i> Variación en p27 y procesamiento de la proteína F en cepa aislada.	92
<i>Figura 19.</i> Dinámica de subgrupos antigénicos del VSRh en Panamá durante los brotes epidémicos (2006–2024)	115
<i>Figura 20.</i> Dinámica de linajes del VSRh-A en Panamá durante los brotes epidémicos (2006–2024)	116
<i>Figura 21.</i> Dinámica de linajes del VSRh-B en Panamá durante los brotes epidémicos (2010–2024)	117

CAPÍTULO II: *PANORAMA GENÓMICO, DIVERSIDAD, PATRONES DE REEMPLAZO Y VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ A LO LARGO DE 20 AÑOS*

<i>Figura 22.</i> Dinámica estacional del MPVh en Panamá	131
<i>Figura 23.</i> Curva de supervivencia de la duración de la predominancia de VSRh en Panamá	133
<i>Figura 24.</i> Árbol filogenético del hMPV-A por brotes estacionales	135
<i>Figura 25.</i> Árbol filogenético del hMPV-B por brotes estacionales	137
<i>Figura 26.</i> Distribución temporal de los linajes circulantes en Panamá	137
<i>Figura 27.</i> Matriz de identidad nucleotídica de la proteína F de MPVh en Panamá	141
<i>Figura 28.</i> Filogenia del gen F del MPVh-A	142
<i>Figura 29.</i> Filogenia del gen F del MPVh-B	145

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
INTRODUCCIÓN:	
<i>ESTADO DEL ARTE DEL RSVh Y MPVh</i>	
<i>Tabla I. Resumen de antivirales en desarrollo contra el VSRh</i>	55
<i>Tabla II. Resumen de antivirales en desarrollo contra el MPVh</i>	63
CAPÍTULO I:	
<i>DINÁMICA EVOLUTIVA Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VSRh EN PANAMÁ (2006–2024): CLASIFICACIÓN FILOGENÓMICA Y EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN ANTIGÉNICA FRENTE A ANTICUERPOS ANTI-F</i>	
<i>Tabla III. Muestras VSRh: distribución temporal y demográfica en Panamá (2006-2024)</i>	73
<i>Tabla IV. Genomas de VSRh obtenidos y distribuidos por características demográficas (2006-2017)</i>	81
<i>Tabla V. Distribución de los genomas completos de VSRh por linaje y brote estacional (2006–2017)</i>	84
<i>Tabla VI. Distribución de linajes de VSRh y características clínicas y demográficas de los pacientes (2006–2017)</i>	85
<i>Tabla VII. Información sobre las cepas de VSRh aisladas y la seleccionada para el ensayo de neutralización con anticuerpos monoclonales</i>	88
<i>Tabla VIII. Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales frente a VSRh</i>	89
CAPÍTULO II:	
<i>PANORAMA GENÓMICO, DIVERSIDAD, PATRONES DE REEMPLAZO Y VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL METAPNEUMOVIRUS HUMANO EN PANAMÁ A LO LARGO DE 20 AÑOS</i>	
<i>Tabla IX. Características de las muestras MPVh-positivas seleccionadas para el análisis (2006–2025)</i>	126
<i>Tabla X. Características de las 202 muestras MPVh-positivas 202 con Ct <28 fueron utilizadas para la secuenciación del genoma completo (2006–2025)</i>	126
<i>Tabla XI. Genomas de MPVh obtenidos, distribuidos por período de circulación, grupo antigénico y características demográficas de los pacientes en Panamá</i>	132
<i>Tabla XII. Distribución de los genomas completos de MPVh por linaje y brotes epidémicos (2006–2025)</i>	137

<i>Tabla XIII.</i> Linajes de MPVh involucradas en los brotes estacionales de 2006–2025 según las características clínicas y demográficas de los pacientes	138
<i>Tabla XIV.</i> Asociación estadística entre los linajes de MPVh y las características demográficas mediante la prueba de chi-cuadrado de independencia.	139
<i>Tabla XV.</i> Sustituciones aminoacídicas en la proteína F de MPVh en los subgrupos A, B1 y B2 durante 2006–2025	146

CERTIFICADOS

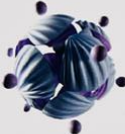
Participación como expositor - XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología APANAC (2023)



Participación como expositor - I Simposio Nacional sobre el Virus Sincitial Respiratorio
(2024)



Presentación de póster - XVII Congreso Nacional de Virología (2024)
Sociedad Española de Virología



XVII
CONGRESO NACIONAL
DE VIROLOGÍA



CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN
El trabajo titulado:
“Genomic Characterization of Respiratory Syncytial Virus in Panama”
Danilo Franco, Stephanie Goya, Claudia González, Ambar Moreno, Alexander Martínez, Melissa Gaitán, Elimelec Valdespino, Brechla Moreno, Zeuz Capitan-Barrios, Jean Paul Carrera, Sandra López Vergés, Juan Miguel Pascale, Belmaris Rizo, Enrique Urriola, Suman R Das, Juan Arbiza, Adriana Delfraro and Leyda Ábrego
Se ha presentado como póster en el XVII Congreso Nacional de Virología celebrado en Santiago de Compostela entre los días 2 y 5 de septiembre de 2024



Jesús López Romalde
Presidente Comité Organizador

Presentación de póster - Congreso Gorgas 2025

REPÚBLICA DE PANAMÁ



INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD (ICGES)

En Conmemoración a los 97 años de Aniversario del ICGES

CERTIFICA QUE EL TRABAJO TITULADO:

Estudio genómico sobre los patrones de circulación del RSV
y su neutralización mediante anticuerpos monoclonales anti-F
en Panamá (2018-2024)

Con los autores:

FRANCO, DANILO; Goya, Stephanie; Martínez, Alexander Mas, Vicente; Moreno, Brechla;
Valdespino, Elimelec; Gaitán, Melissa; Sáenz, Lisseth; González, Claudia; Moreno, Ambar;
Capitan-Barrios, Zeuz; Carrera, Jean Paul; López-Vergès, Sandra; Pascale, Juan Miguel;
Moltó, Yadira; Moreno, Lourdes; Rizo, Belmaris; Urriola, Enrique; Delgado, Teresa; Iglesias-
Caballero, María; Casas, Inmaculada; Das, Suman R.; Arbiza, Juan; Delfraro, Adriana; Ábrego, Leyda
HA SIDO EVALUADO Y SELECCIONADO PARA PRESENTAR EN LA MODALIDAD DE AFICHE.

CONGRESO **GORGAS** 2025

RUMBO A LOS 100 AÑOS

1928-2028

Realizado en el Sortis Hotel, Spa & Casino
Ciudad de Panamá, 11 al 13 de agosto del 2025

Director General

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES)

“UN
MUNDO,
UNA
SALUD,
CIENCIA
que conecta
VIDAS”

INNOVACIÓN
INTERDISCIPLINARIA
FRENTA A LOS
DESAFÍOS
SANITARIOS
GLOBALES



Participación como expositor – XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología APANAC
(2025)



Presentación del póster sobre Metapneumovirus humano - XVI Congreso Nacional de Laboratoristas Clínicos 2025



Nota: el póster obtuvo el segundo lugar como trabajo destacado.

MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL ARTÍCULO CIENTÍFICO: Genomic Insights Into Respiratory Syncytial Virus Circulation Patterns And Neutralization By Anti-F Monoclonal Antibodies In Panama (2018–2024)

Supplemental Material

List of Two hundred seventy-seven (277) complete reference genomes of RSV-A subgroup, downloaded from the RSV Genotyping Consensus Consortium (<https://github.com/rsv-lineages>). Data obtained on August 26, 2024.

1. A.1/MG642060/USA/1980
2. A.1/MG642067/USA/1987
3. A.1/MG642075/USA/1986
4. A.1/OK649589/USA/1994
5. A.1/OK649593/USA/1995
6. A.2.1.1/KF973325/USA/2002
7. A.2.1.1/KF973335/USA/2002
8. A.2.1.1/KJ627716/USA/2003
9. A.2.1.1/KJ627719/USA/2004
10. A.2.1.1/KJ627721/USA/2004
11. A.2.1.1/OK649606/Brazil/2008
12. A.2.1.1/OK649637/Brazil/2009
13. A.2.1.1/OK649646/Brazil/2010
14. A.2.1/KJ627657/USA/2003
15. A.2.1/KJ627671/USA/2003
16. A.2.1/KJ627673/USA/2001
17. A.2.1/KJ627705/USA/2001
18. A.2.1/KJ627710/USA/2001
19. A.2.1/KJ627733/USA/2003
20. A.2/MG642028/USA/1980
21. A.2/MG642052/USA/1994
22. A.2/MG642055/USA/1990
23. A.2/MG642058/USA/1980
24. A.2/MG642079/USA/1982
25. A.3.1.1/KJ627738/USA/2013
26. A.3.1.1/KY654506/Philippines/2012
27. A.3.1.1/KY654508/Philippines/2012
28. A.3.1.1/MF001043/USA/2015
29. A.3.1.1/OK649639/Brazil/2009
30. A.3.1.1/OK649647/Brazil/2010
31. A.3.1.1/ON237251/Argentina/2015
32. A.3.1.1/ON237255/Argentina/2015
33. A.3.1/MF001041/USA/2015
34. A.3.1/MH181883/Kenya/2012
35. A.3.1/MK109777/Jordan/2011
36. A.3.1/OK649604/Brazil/2008
37. A.3.1/OK649610/Brazil/2008
38. A.3.1/OK649623/Brazil/2008
39. A.3.1/OK649628/Brazil/2008
40. A.3.1/OK649633/Brazil/2008
41. A.3.1/OK649645/Brazil/2010
42. A.3/KJ627647/USA/2001
43. A.3/MG642026/USA/1982
44. A.3/MG642033/USA/1994
45. A.3/MG642034/USA/1985
46. A.3/MG642035/USA/1984
47. A.3/MG642070/USA/1986
48. A.3/MG642080/USA/1994
49. A.3/OK649614/Brazil/2008
50. A.3/OK649627/Brazil/2008
51. A.3/OK649642/Brazil/2010
52. A.3/OK649678/USA/2005
53. A.3/OK649679/USA/2005
54. A.D.1.1/EPI-ISL-11817023/Australia/2021
55. A.D.1.1/EPI-ISL-11817069/Australia/2021
56. A.D.1.1/EPI-ISL-11817092/Australia/2021
57. A.D.1.2/OM857140/Australia/2021
58. A.D.1.2/OM857152/Australia/2020
59. A.D.1.2/OM857155/Australia/2020
60. A.D.1.2/OM857177/Australia/2021
61. A.D.1.2/OM857180/Australia/2020
62. A.D.1.2/OM857200/Australia/2020
63. A.D.1.3/OM857216/Australia/2020
64. A.D.1.3/OM857267/Australia/2021
65. A.D.1.3/OM857271/Australia/2020
66. A.D.1.3/OM857282/Australia/2020
67. A.D.1.3/OM857283/Australia/2020
68. A.D.1.3/OM857312/Australia/2020
69. A.D.1.3/OM857320/Australia/2020
70. A.D.1.3/OM857360/Australia/2021
71. A.D.1.4/OQ024155/USA/2022
72. A.D.1.4/OR143137/USA/2022
73. A.D.1.4/OY757595/Australia/2022
74. A.D.1.4/PP352344/USA/2022

75. A.D.1.4/PP681283/USA/2022
76. A.D.1.4/PP770472/USA/2024
77. A.D.1.5/OQ171906.1/USA/2022
78. A.D.1.5/OR143171.1/USA/2023
79. A.D.1.6/PP135017.1/USA/2023
80. A.D.1.6/PP352345.1/USA/2022
81. A.D.1.6/PP795136.1/USA/2023
82. A.D.1.7/OQ171911.1/USA/2022
83. A.D.1.7/PP203260.1/USA/2022
84. A.D.1.8/OR287988.1/USA/2021
85. A.D.1.8/PP352324.1/USA/2021
86. A.D.1.8/PP973760.1/USA/2024
87. A.D.1/MZ221198/China/2018
88. A.D.1/MZ515573/United-Kingdom/2020
89. A.D.1/MZ515583/Spain/2019
90. A.D.1/MZ515649/Netherlands/2019
91. A.D.1/MZ515773/Spain/2020
92. A.D.1/MZ515777/Spain/2019
93. A.D.1/MZ515803/Netherlands/2019
94. A.D.1/MZ515907/United-Kingdom/2019
95. A.D.1/MZ515929/United-Kingdom/2018
96. A.D.1/MZ515931/Netherlands/2019
97. A.D.1/MZ515945/Netherlands/2018
98. A.D.1/MZ515961/Spain/2020
99. A.D.1/MZ515969/United-Kingdom/2019
100. A.D.1/MZ516000/United-Kingdom/2019
101. A.D.1/MZ516029/United-Kingdom/2019
102. A.D.1/MZ516033/Spain/2020
103. A.D.1/MZ516040/United-Kingdom/2019
104. A.D.1/MZ516058/Netherlands/2017
105. A.D.1/MZ516073/United-Kingdom/2019
106. A.D.1/MZ516137/United-Kingdom/2019
107. A.D.1/ON237313/Argentina/2017
108. A.D.1/OQ171909/USA/2022
109. A.D.1/OQ261751/Austria/2022
110. A.D.2.1/MZ515701/Netherlands/2019
111. A.D.2.1/MZ515859/Netherlands/2019
112. A.D.2.1/MZ515877/Netherlands/2019
113. A.D.2.1/MZ516038/Netherlands/2019
114. A.D.2.2.1/LR699737/United-Kingdom/2017
115. A.D.2.2.1/MZ515575/United-Kingdom/2018
116. A.D.2.2.1/MZ515609/Spain/2019
117. A.D.2.2.1/MZ515850/United-Kingdom/2018
118. A.D.2.2.1/MZ515851/Spain/2018
119. A.D.2.2.1/MZ515956/Spain/2019
120. A.D.2.2.1/MZ516026/Netherlands/2019
121. A.D.2.2.1/ON237289/Argentina/2016
122. A.D.2.2/MH383066/Lebanon/2014
123. A.D.2.2/MK749886/Nicaragua/2016
124. A.D.2.2/MK749893/Nicaragua/2016
125. A.D.2.2/MK749911/Nicaragua/2016
126. A.D.2.2/MN630100/USA/2016
127. A.D.2.2/MZ515703/Netherlands/2018
128. A.D.2.2/MZ515835/Netherlands/2018
129. A.D.2.2/MZ515939/Netherlands/2017
130. A.D.2.2/MZ516072/United-Kingdom/2019
131. A.D.2.2/ON237253/Argentina/2015
132. A.D.2.2/ON237273/Argentina/2015
133. A.D.2.2/ON237301/Argentina/2017
134. A.D.2.2/ON237336/Argentina/2017
135. A.D.2.2/ON237340/Argentina/2017
136. A.D.2/MK749912/Nicaragua/2015
137. A.D.2/MK749913/Nicaragua/2016
138. A.D.2/MZ515901/Netherlands/2019
139. A.D.2/ON237272/Argentina/2015
140. A.D.3.1/EPI-ISL-15896149/Australia/2022
141. A.D.3.1/EPI-ISL-15896158/Australia/2022
142. A.D.3.1/EPI-ISL-15896167/Australia/2022
143. A.D.3.1/EPI-ISL-15896183/Australia/2022
144. A.D.3.1/EPI-ISL-15896222/Australia/2022
145. A.D.3.1/EPI-ISL-16714780/Australia/2022
146. A.D.3.2/OR143195.1/USA/2022
147. A.D.3.2/PP135024.1/USA/2023
148. A.D.3.2/PP508181.1/Peru/2022-05-30
149. A.D.3.3/PP530269.1/USA/2024
150. A.D.3.3/PP748752.1/USA/2021
151. A.D.3.3/PP770461.1/USA/2024
152. A.D.3.4/OQ024115.1/USA/2022
153. A.D.3.4/OQ261753.1/Austria/2022
154. A.D.3.4/OR143204.1/USA/2022
155. A.D.3.5/OR795475.1/Germany/2022
156. A.D.3.5/PP709453.1/USA/2024
157. A.D.3.6/PP237786.1/USA/2023
158. A.D.3.6/PP401817.1/USA/2023
159. A.D.3.6/PP504647.1/USA/2023
160. A.D.3/MN306029/USA/2019
161. A.D.3/MT422270/Russia/2019
162. A.D.3/MZ151853/Russia/2020
163. A.D.3/MZ515619/Spain/2019
164. A.D.3/MZ515679/United-Kingdom/2020
165. A.D.3/MZ515693/Spain/2020
166. A.D.3/MZ515731/Netherlands/2018
167. A.D.3/MZ515923/United-Kingdom/2019
168. A.D.3/MZ516023/United-Kingdom/2020
169. A.D.3/MZ516039/Netherlands/2019
170. A.D.3/MZ516110/Netherlands/2018
171. A.D.3/MZ516112/United-Kingdom/2019
172. A.D.3/OK500256/France/2021
173. A.D.3/ON152648/Russia/2021
174. A.D.3/OP890340/USA/2022
175. A.D.3/OQ261748/Austria/2021
176. A.D.4.1/EPI-ISL-11055718/South-Africa/2022

177. A.D.4.1/EPI-ISL-11055743/South-Africa/2021
178. A.D.4.1/EPI-ISL-12529638/South-Africa/2021
179. A.D.4.1/EPI-ISL-12529640/South-Africa/2021
180. A.D.4.1/EPI-ISL-12529643/South-Africa/2021
181. A.D.4.1/MZ515682/United-Kingdom/2019
182. A.D.4/MH181991/Kenya/2013
183. A.D.4/MH182003/Kenya/2014
184. A.D.4/MH182010/Kenya/2014
185. A.D.4/MH182012/Kenya/2014
186. A.D.4/MH182018/Kenya/2014
187. A.D.4/MH182019/Kenya/2014
188. A.D.4/MH182031/Kenya/2015
189. A.D.4/MH182036/Kenya/2015
190. A.D.4/MH182049/Kenya/2015
191. A.D.5.1/EPI-ISL-11055722/South-Africa/2022
192. A.D.5.1/EPI-ISL-11055747/South-Africa/2021
193. A.D.5.1/EPI-ISL-11055760/South-Africa/2021
194. A.D.5.1/MZ515749/United-Kingdom/2019
195. A.D.5.2/EPI-ISL-15055327/Argentina/2021
196. A.D.5.2/OK500258/France/2021
197. A.D.5.2/OP890318/USA/2022
198. A.D.5.2/OP890321/USA/2022
199. A.D.5.2/OP890332/USA/2022
200. A.D.5.2/OP890338/USA/2022
201. A.D.5.2/OP890339/USA/2022
202. A.D.5.2/OQ024127/USA/2022
203. A.D.5.2/OQ171903/USA/2022
204. A.D.5.3/EPI-ISL-16959591/New-Zealand/2021
205. A.D.5.3/EPI-ISL-16959666/New-Zealand/2021
206. A.D.5.3/EPI-ISL-16959728/New-Zealand/2021
207. A.D.5.3/EPI-ISL-16959943/New-Zealand/2021
208. A.D.5.3/EPI-ISL-16960085/New-Zealand/2021
209. A.D.5.3/EPI-ISL-16960101/New-Zealand/2021
210. A.D.5.4/PP135013.1/USA/2023
211. A.D.5.4/PP237781.1/USA/2023
212. A.D.5/EPI-ISL-15055318/Argentina/2019
213. A.D.5/EPI-ISL-15120672/Morocco/2014
214. A.D.5/MZ515616/Netherlands/2019
215. A.D.5/MZ515782/United-Kingdom/2018
216. A.D.5/MZ515884/Netherlands/2019
217. A.D.5/ON237271/Argentina/2015
218. A.D.5/ON237320/Argentina/2017
219. A.D.5/OP320383/Philippines/2019
220. A.D.5/OP320385/Philippines/2019
221. A.D.5/OP320394/Philippines/2019
222. A.D.5/OP320399/Philippines/2020
223. A.D/KJ627735/USA/2013
224. A.D/KY654513/Philippines/2013
225. A.D/KY654515/Philippines/2012
226. A.D/KY982516/USA/2013
227. A.D/MF614946/China/2012
228. A.D/MF614947/China/2013
229. A.D/MH181911/Kenya/2012
230. A.D/MH181917/Kenya/2012
231. A.D/MH181927/Kenya/2012
232. A.D/MH181931/Kenya/2012
233. A.D/MH181938/Kenya/2012
234. A.D/MH181940/Kenya/2012
235. A.D/MH181941/Kenya/2012
236. A.D/MH181945/Kenya/2012
237. A.D/MH181947/Kenya/2012
238. A.D/MH181948/Kenya/2012
239. A.D/MH181960/Kenya/2012
240. A.D/MH181969/Kenya/2012
241. A.D/MH181974/Kenya/2012
242. A.D/MH181982/Kenya/2013
243. A.D/MH181985/Kenya/2013
244. A.D/MH279547/China/2017
245. A.D/MH447953/Thailand/2013
246. A.D/MH447956/Thailand/2014
247. A.D/MH447957/Thailand/2016
248. A.D/MN630090/USA/2016
249. A.D/MN630093/USA/2016
250. A.D/MN630106/USA/2016
251. A.D/MW020596/Australia/2018
252. A.D/MW020598/Australia/2017
253. A.D/MZ221197/China/2018
254. A.D/MZ221199/China/2018
255. A.D/MZ515600/United-Kingdom/2018
256. A.D/MZ515802/United-Kingdom/2019
257. A.D/MZ515913/Netherlands/2019
258. A.D/MZ515973/Netherlands/2017
259. A.D/MZ516057/Netherlands/2019
260. A.D/MZ516076/United-Kingdom/2018
261. A.D/OK649682/USA/2012
262. A.D/ON237225/Argentina/2014
263. A.D/ON237229/Argentina/2014
264. A.D/ON237230/Argentina/2014
265. A.D/ON237243/Argentina/2014
266. A.D/ON237250/Argentina/2015
267. A.D/ON237252/Argentina/2015
268. A.D/ON237254/Argentina/2015
269. A.D/ON237258/Argentina/2015

270. A.D/ON237259/Argentina/2015
 271. A.D/ON237276/Argentina/2016
 272. A.D/ON237277/Argentina/2016
 273. A.D/ON237280/Argentina/2016

274. A.D/ON237286/Argentina/2016
 275. A.D/ON237293/Argentina/2016
 276. A.D/ON237298/Argentina/2017
 277. A.D/ON729319/USA/2019

List of One hundred forty-five (145) complete reference genomes of RSV-A subgroup, downloaded from the RSV Genotyping Consensus Consortium (<https://github.com/rsv-lineages>). Data obtained on August 26, 2024.

1. B.1/MG642037/USA/1980
 2. B.1/MG642044/USA/1982
 3. B.1/MG642045/USA/1979
 4. B.1/MG642065/USA/1981
 5. B.2/MG642036/USA/1989
 6. B.2/MG642054/USA/1991
 7. B.2/MG642057/USA/1984
 8. B.2/MG642076/USA/1987
 9. B.3/MG642049/USA/1993
 10. B.3/MG642064/USA/1995
 11. B.4/JX198144/USA/1994
 12. B.4/OK649748/USA/1992
 13. B.D.1.1/KY249666/United-Kingdom/2013
 14. B.D.1.1/ON237110/Argentina/2014
 15. B.D.1.1/ON237115/Argentina/2014
 16. B.D.1/KY249662/United-Kingdom/2013
 17. B.D.1/MH594430/Kenya/2010
 18. B.D.1/OK649699/Brazil/2009
 19. B.D.2/MH594352/Kenya/2010
 20. B.D.2/MH594457/Kenya/2010
 21. B.D.2/MH594461/Kenya/2010
 22. B.D.3/MH594379/Kenya/2010
 23. B.D.3/MH594402/Kenya/2010
 24. B.D.3/MH594407/Kenya/2010
 25. B.D.3/MH594415/Kenya/2010
 26. B.D.4.1.1/EPI-ISL-11055802/South-Africa/2021
 27. B.D.4.1.1/EPI-ISL-11817058/Australia/2021
 28. B.D.4.1.1/EPI-ISL-11817060/Australia/2021
 29. B.D.4.1.1/EPI-ISL-12529656/South-Africa/2021
 30. B.D.4.1.1/EPI-ISL-14769847/South-Africa/2022
 31. B.D.4.1.1/EPI-ISL-15067710/Argentina/2018
 32. B.D.4.1.1/EPI-ISL-15728620/South-Africa/2022
 33. B.D.4.1.1/EPI-ISL-15728627/South-Africa/2022
 34. B.D.4.1.1/EPI-ISL-15774019/Australia/2021
 35. B.D.4.1.1/EPI-ISL-16714597/England/2021
 36. B.D.4.1.1/EPI-ISL-16714599/England/2021

37. B.D.4.1.1/EPI-ISL-16714651/England/2021
 38. B.D.4.1.1/MT373705/Russia/2019
 39. B.D.4.1.1/MZ151850/Russia/2019
 40. B.D.4.1.1/MZ515553/United-Kingdom/2019
 41. B.D.4.1.1/MZ515561/United-Kingdom/2019
 42. B.D.4.1.1/MZ515562/Netherlands/2018
 43. B.D.4.1.1/MZ515590/United-Kingdom/2019
 44. B.D.4.1.1/MZ515599/Netherlands/2019
 45. B.D.4.1.1/MZ515636/United-Kingdom/2019
 46. B.D.4.1.1/MZ515656/Spain/2019
 47. B.D.4.1.1/MZ515658/Netherlands/2018
 48. B.D.4.1.1/MZ515665/Netherlands/2017
 49. B.D.4.1.1/MZ515716/United-Kingdom/2018
 50. B.D.4.1.1/MZ515743/Netherlands/2017
 51. B.D.4.1.1/MZ515761/Netherlands/2018
 52. B.D.4.1.1/MZ515779/United-Kingdom/2018
 53. B.D.4.1.1/MZ515827/Spain/2019
 54. B.D.4.1.1/MZ515837/United-Kingdom/2019
 55. B.D.4.1.1/MZ515904/United-Kingdom/2020
 56. B.D.4.1.1/MZ515926/Netherlands/2017
 57. B.D.4.1.1/MZ515975/Netherlands/2019
 58. B.D.4.1.1/MZ516021/United-Kingdom/2018
 59. B.D.4.1.1/MZ516054/Spain/2019
 60. B.D.4.1.1/MZ516061/United-Kingdom/2018
 61. B.D.4.1.1/MZ516143/Spain/2019
 62. B.D.4.1.1/OM857370/Australia/2020
 63. B.D.4.1.1/OM857373/Australia/2019
 64. B.D.4.1.1/OM857375/Australia/2020
 65. B.D.4.1.1/OM857381/Australia/2020
 66. B.D.4.1.1/OM857393/Australia/2020
 67. B.D.4.1.1/OP975389/Australia/2019
 68. B.D.4.1.1/OQ261736/Austria/2019

69. B.D.4.1.1/OQ261743/Austria/2022
70. B.D.4.1/EPI-ISL-15120696/Morocco/2016
71. B.D.4.1/EPI-ISL-15120725/Morocco/2016
72. B.D.4.1/EPI-ISL-15120751/Morocco/2017
73. B.D.4.1/EPI-ISL-15120753/Morocco/2017
74. B.D.4.1/KY249660/United-Kingdom/2013
75. B.D.4.1/KY249683/United-Kingdom/2016
76. B.D.4.1/LC385008/Philippines/2016
77. B.D.4.1/LR699735/United-Kingdom/2017
78. B.D.4.1/LR699740/Spain/2018
79. B.D.4.1/LR699742/Spain/2017
80. B.D.4.1/MH327947/India/2017
81. B.D.4.1/MK749869/Nicaragua/2016
82. B.D.4.1/MK749877/Nicaragua/2015
83. B.D.4.1/MK749915/Nicaragua/2016
84. B.D.4.1/MT040088/USA/2016
85. B.D.4.1/MZ515674/Netherlands/2018
86. B.D.4.1/MZ516082/Netherlands/2017
87. B.D.4.1/MZ516104/Netherlands/2018
88. B.D.4.1/ON237091/Argentina/2014
89. B.D.4.1/ON237138/Argentina/2015
90. B.D.4.1/ON237168/Argentina/2015
91. B.D.4.1/ON237186/Argentina/2016
92. B.D.4.1/ON237208/Argentina/2016
93. B.D.4.1/ON237214/Argentina/2017
94. B.D.4/KY249656/United-Kingdom/2014
95. B.D.4/KY249677/United-Kingdom/2012
96. B.D.4/LC385007/Philippines/2015
97. B.D.4/MK109786/Jordan/2012
98. B.D.4/MZ516025/Netherlands/2017
99. B.D.4/OK649704/Brazil/2009
100. B.D.4/OK649726/Brazil/2010
101. B.D.4/ON237114/Argentina/2014
102. B.D.4/ON237134/Argentina/2015
103. B.D.4/ON237159/Argentina/2015
104. B.D.4/ON237167/Argentina/2015
105. B.D.E.1/OP890343/USA/2022
106. B.D.E.1/OP890347/USA/2022
107. B.D.E.1/OP965698/USA/2021
108. B.D.E.1/OP965703/USA/2021
109. B.D.E.1/OQ357797/USA/2022
110. B.D.E.2/MZ515997/Netherlands/2018
111. B.D.E.2/MZ516102/United-Kingdom/2019
112. B.D.E.2/MZ516135/Netherlands/2018
113. B.D.E.2/OM857390/Australia/2020
114. B.D.E.3/EPI-ISL-16533866/Austria/2022
115. B.D.E.3/EPI-ISL-16714385/England/2021
116. B.D.E.3/EPI-ISL-16714627/England/2021
117. B.D.E.4/EPI-ISL-15896190/Australia/2022
118. B.D.E.4/EPI-ISL-16714784/Australia/2022
119. B.D.E.4/EPI-ISL-16959502/New-Zealand/2021
120. B.D.E.4/EPI-ISL-16959704/New-Zealand/2021
121. B.D.E.4/EPI-ISL-16960135/New-Zealand/2021
122. B.D.E.4/EPI-ISL-17066801/Australia/2022
123. B.D.E.4/OM857382/Australia/2021
124. B.D.E.4/OM857387/Australia/2021
125. B.D.E.4/OM857388/Australia/2020
126. B.D/EPI-ISL-6494896/England/2008
127. B.D/KY249663/United-Kingdom/2013
128. B.D/MH594400/Kenya/2010
129. B.D/MH594451/Kenya/2010
130. B.D/MK109765/Jordan/2011
131. B.D/MK109766/Jordan/2013
132. B.D/MK109779/Jordan/2010
133. B.D/MK109780/Jordan/2013
134. B.D/MK109781/Jordan/2011
135. B.D/MW582529/Germany/2015
136. B.D/OK649702/Brazil/2009
137. B.D/OK649703/Brazil/2009
138. B.D/OK649706/Brazil/2009
139. B.D/OK649719/Brazil/2009
140. B.D/OK649720/Brazil/2009
141. B.D/OK649724/Brazil/2010
142. B.D/OK649725/Brazil/2010
143. B.D/ON237105/Argentina/2014
144. B.D/ON237140/Argentina/2015
145. B.D/ON237165/Argentina/2015

Table I: RSV genomes obtained, distributed by epidemic outbreak (2018 to 2024), antigenic subgroup, and demographic characteristics of patients in Panama

Of patients in Panama																			
Characteristics	RSV - Epidemic Outbreaks																	Total (%)	
	2018			2019-20			2021			2022			2023			2024			
	Type		Total	Type		Total	Type		Total	Type		Total	Type		Total	Type			Total
	A	B		A	B		A	B		A	B		A	B					
No. complete genomes	8	10	18	20	9	29	0	8	8	19	1	20	10	10	20	17	3	20	115 (100)
Gender																			
Male	5	5	10	7	1	8	0	6	6	13	0	13	5	7	12	13	2	15	64 (55.7)
Female	3	5	8	13	8	21	0	2	2	6	1	7	5	3	8	4	1	5	51 (44.3)
Clinical Status																			
Hospitalized	8	10	18	19	7	26	0	3	3	0	0	0	7	5	12	16	3	19	78 (67.8)
Outpatient	0	0	0	1	1	2	0	5	5	19	1	20	3	5	8	1	0	1	36 (31.3)
Deceased	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.9)
Patient age, y																			
< 1	7	9	16	15	8	23	0	4	4	6	1	7	5	4	9	11	2	13	72 (62.6)
1 - 4	1	1	2	5	1	6	0	4	4	9	0	9	2	5	7	6	1	7	35 (30.4)
5 - 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	3	1	4	0	0	0	8 (7.0)
Geographic Area																			
MA&P	4	3	7	8	1	9	0	6	6	19	1	20	8	3	11	12	3	15	68 (59.1)
The Rest of the Country	4	7	11	12	8	20	0	2	2	0	0	0	2	7	9	5	0	5	47 (40.9)

RSV, respiratory syncytial virus; “A”, RSV subgroup A; “B”, RSV subgroup B; MA&P, Metropolitan area and periphery. Between 2018 and 2024, 115 complete RSV genomes were obtained, with 64.3% corresponding to RSV-A and 35.7% to RSV-B. Most genomes were from children under 1 year old (62.6%) and hospitalized patients (67.8%). Additionally, 59.1% of the cases were recorded in the metropolitan area and its periphery.

Table II: Clinical and demographic characteristics of RSV-positive cases (2018-2024) sequenced by WGS and grouped by epidemic outbreak and lineage found.

Characteristics	2018						2019-20						2021			2022						2023								2024					Total (%)		
	A.D	A.D.1	A.D.2.2	A.D.3	B.D.4.1.1	Total	A.D	A.D.1	A.D.2.2.1	A.D.5	B.D.4.1.1	Total	B.D.4.1.1	B.D.E.1	Total	A.D.1	A.D.1.7	A.D.3.2	A.D.3.3	B.D.E.1	Total	A.D.1	A.D.1.5	A.D.1.7	A.D.3	A.D.5.2	B.D.4.1.1	B.D.E.1	Total	A.D.3	A.D.3.2	A.D.5.2	B.D.E.1	Total			
No. complete genomes	3	1	2	2	10	18	2	16	1	1	9	29	1	7	8	13	2	2	2	1	20	1	1	1	2	5	6	4	20	3	6	8	3	20	115 (100)		
Gender																																					
Male	2	1	0	2	5	10	1	6	0	0	1	8	1	5	6	8	2	1	2	0	13	1	0	0	2	2	5	2	12	2	5	6	2	15	64 (55.7)		
Female	1	0	2	0	5	8	1	10	1	1	8	21	0	2	2	5	0	1	0	1	7	0	1	1	0	3	1	2	8	1	1	2	1	5	51 (44.3)		
Clinical Status																																					
Hospitalized	3	1	2	2	10	18	2	16	0	1	7	26	1	2	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	4	1	12	3	5	8	3	19	78 (67.8)		
Outpatient	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	5	5	13	2	2	2	1	20	0	0	0	1	2	2	3	8	0	1	0	0	1	36 (31.3)		
Deceased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.9)			
Patient age, y																																					
< 1	3	1	2	1	9	16	1	14	0	0	8	23	1	3	4	4	2	0	0	1	7	1	1	1	1	1	2	2	9	2	3	6	2	13	72 (62.6)		
1 - 4	0	0	0	1	1	2	1	2	1	1	1	6	0	4	4	6	0	1	2	0	9	0	0	0	0	2	4	1	7	1	3	2	1	7	35 (30.4)		
5 - 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	4	0	0	0	1	2	0	1	4	0	0	0	0	0	8 (7.0)		
Geographic Area																																					
MA&P	2	0	2	0	3	7	2	5	1	0	1	9	1	5	6	13	2	2	2	1	20	0	0	1	2	5	0	3	11	3	1	8	3	15	68 (59.1)		
The Rest of the Country	1	1	0	2	7	11	0	11	0	1	8	20	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	6	1	9	0	5	0	0	5	47 (40.9)		
RSV, respiratory syncytial virus; “A”, RSV subtype A; “B”, RSV subtype B; MA&P, Metropolitan area and periphery.																																					

Statistical association between the RSV lineages found and Demographic characteristics

Table III: Statistical Association Between RSV Lineages and Demographic Characteristics Using Chi-Square Test of Independence

Characteristics	Lineages					
	RSV-A			RSV-B		
	Chi Square	Degrees of Freedom	P-value	Chi Square	Degrees of Freedom	P-value
Gender	12.2	10	0.272	0.730	1	0.393
Clinical Status	16.32	10	0.091	10.98	2	<u>0.004</u>
Patient age, y	13.29	10	0.208	3.439	2	0.179
Geographic Area	19.6	10	<u>0.033</u>	14.470	1	<u>0.0001</u>

The Chi Square and p-values obtained from the analysis are shown by lineages, separated by subgroups. For clinical status, in RSV-A lineages the deceased variable was not considered due to insufficient data. For patient age, in RSV-A lineages the 5-50 age range was not considered due to insufficient data.

Analysis performed at <https://www.openepi.com/RbyC/RbyC.htm>

Table IV: RSV lineages involved in the 2018-2024 epidemic outbreaks based on the clinical and demographic characteristics of the patients

Characteristics	RSV-A Lineages											Total RSV-A	RSV-B Lineages		Total RSV-B	Total (%)
	A.D.	A.D.1	A.D.1.5	A.D.1.7	A.D.2.2	A.D.2.2.1	A.D.3	A.D.3.2	A.D.3.3	A.D.5	A.D.5.2		B.D.4.1.1	B.D.E.1		
No. complete genomes	5	31	1	3	2	1	7	8	2	1	13	74	26	15	41	115 (100)
Gender																
Male	3	16	0	2	0	0	6	6	2	0	8	43	12	9	21	64 (55.7)
Female	2	15	1	1	2	1	1	2	0	1	5	31	14	6	20	51 (44.3)
Clinical Status																
Hospitalized	5	18	1	1	2	0	6	5	0	1	11	50	22	6	28	78 (67.8)
Outpatient	0	13	0	2	0	1	1	3	2	0	2	24	3	9	12	36 (31.3)
Deceased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.9)
Patient age, y																
< 1	4	20	1	3	2	0	4	3	0	0	7	44	20	8	28	72 (62.6)
1 - 4	1	8	0	0	0	1	2	4	2	1	4	23	6	6	12	35 (30.4)
5 - 50	0	3	0	0	0	0	1	1	0	0	2	7	0	1	1	8 (7.0)
Geographic Area																
MA&P	4	18	0	3	2	1	5	3	2	0	13	51	5	12	17	68 (59.1)
The Rest of the Country	1	13	1	0	0	0	2	5	0	1	0	23	21	3	24	47 (40.9)

RSV, respiratory syncytial virus; “A”, RSV subtype A; “B”, RSV subtype B; MA&P, Metropolitan area and periphery.

Table V: Information about the RSV strains isolated and those selected for the neutralization assay with mAbs									
Subgroup	Strain Name	Ct values (original sample)	Lineage	F Protein Mutations (compared against NCBI references)			F Protein Mutations (GISAID references)	NT	
				Binding Site					Other mutations
				Nirsevimab	Motavizumab	Clerosovimab			
RSV-A									
1-	hRSV/A/Panama/ICGES-215/2018	23.2	A.D	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25N, P102A, T103A, N105S, L119I, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, A518V, S540A	L119I, A518V	yes
2-	hRSV/A/Panama/ICGES-198/2018	19.7	A.D.3	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T12I, T16A, F20L, G25N, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T12I, S25N	no
3-	hRSV/A/Panama/ICGES-97/2019	21.1	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	-	no
4-	hRSV/A/Panama/ICGES-127/2019	20.0	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	-	no
5-	hRSV/A/Panama/ICGES-131/2019	20.6	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, N165S, L178V, I379V, V384I, S540A	N165S	no
6-	hRSV/A/Panama/ICGES-134/2019	20.4	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	-	no
7-	hRSV/A/Panama/ICGES-28/2022	22.1	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no

Table V: Information about the RSV strains isolated and those selected for the neutralization assay with mAbs									
Subgroup	Strain Name	Ct values (original sample)	Lineage	F Protein Mutations (compared against NCBI references)				F Protein Mutations (GISAID references)	NT
				Binding Site			Other mutations		
				Nirsevimab	Motavizumab	Clersovimab			
RSV-A									
8-	hRSV/A/Panama/ICGES-32/2022	22.8	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
9-	hRSV/A/Panama/ICGES-37/2022	24.8	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
10-	hRSV/A/Panama/ICGES-40/2022	18.8	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
11-	hRSV/A/Panama/ICGES-45/2022	20.7	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	yes
12-	hRSV/A/Panama/ICGES-43/2022	21.0	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
13-	hRSV/A/Panama/ICGES-44/2022	19.8	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
14-	hRSV/A/Panama/ICGES-59/2022	23.1	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T13A, N124T	no
15-	hRSV/A/Panama/ICGES-60/2022	21.6	A.D.1	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T13A, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124T, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A, K551R	T13A, N124T, K551R	no

Table V: Information about the RSV strains isolated and those selected for the neutralization assay with mAbs									
Subgroup	Strain Name	Ct values (original sample)	Lineage	F Protein Mutations (compared against NCBI references)				F Protein Mutations (GISAID references)	NT
				Binding Site			Other mutations		
				Nirsevimab	Motavizumab	Clersovimab			
RSV-A									
16-	hRSV/A/Panama/ICGES-42/2022	22.0	A.D.3.2	-	-	M447V	L4P, A8T, T12I, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T12I, S276N	yes
17-	hRSV/A/Panama/ICGES-147/2023	18.0	A.D.3	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T12I, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, M115I, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T12I, M115I	yes
18-	hRSV/A/Panama/ICGES-343/2023	16.8	A.D.3	-	N276S	M447V	L4P, A8T, T12I, T16A, F20L, G25S, P102A, T103A, N105S, M115I, A122T, K124N, V139G, V152I, L178V, I379V, V384I, S540A	T12I, M115I	no
RSV-B									
1-	hRSV/B/Panama/ICGES-114/2019	20.8	B.D.4.1.1	I206M and Q209R	-	-	L8S, F45L, A103V, L172Q, S173L, K191R, N234T, T529A,	-	yes
"RSV", respiratory syncytial virus; "RSV-A", RSV subgroup A; “RSV-B”, RSV subgroup B; "NT", Neutralization Test. For the analysis of mutations in the F protein, reference sequences from NCBI GenBank (NC_038235 for RSV-A and NC_001781 for RSV-B) and EpiRSV GISAID (EPI_ISL_412866 for RSV-A and EPI_ISL_1653999 for RSV-B) were used. Nirsevimab binding site in RSV F protein: Residues 62–69 in the F2 subunit and 196–212 in the F1 subunit (Zhu et al., 2017). Motavizumab binding site in RSV F protein: Residues 255–277 in the F1 subunit (Mas et al., 2018). Clersovimab binding site in RSV F protein: Residues E161, S182, and 426–447 in the F1 subunit (Tang et al., 2019).									

Phylogenetic Analysis – Fusion Protein

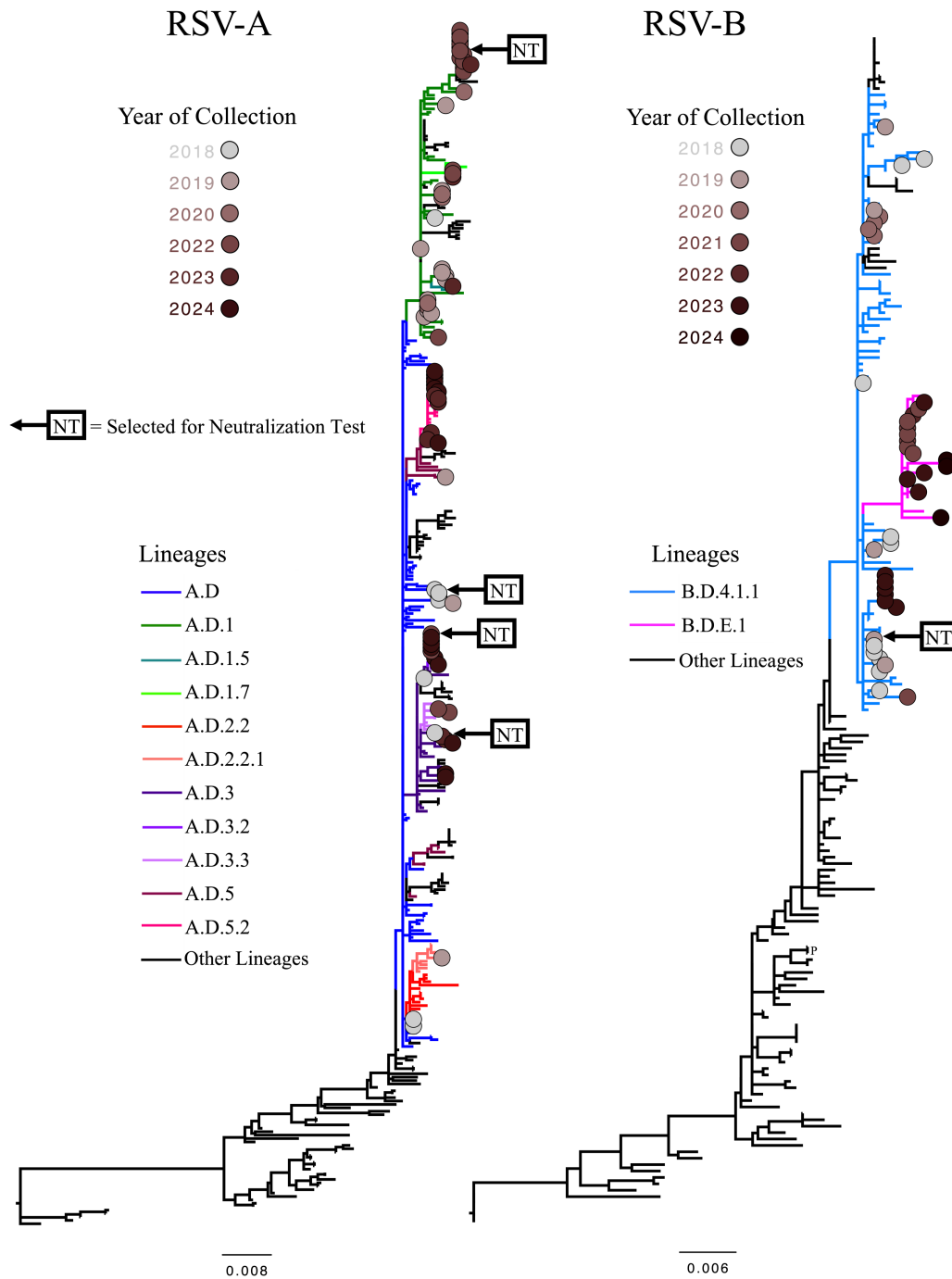


Figure I: Maximum-likelihood phylogenetic trees of *Fusion gen* of RSV-A and RSV-B grouped with reference strains. RSV genomes from Panama are highlighted with circles ranging from light red (2018) to dark red (2024) at branch tips. RSV subgroups are represented by the colors of the tree branches. The isolated strains subjected to neutralization assays (NT) against the F protein are indicated in the tree. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. “RSV-A”, RSV subgroup A; “RSV-B”, RSV subgroup B, “NT”, Neutralization Test.

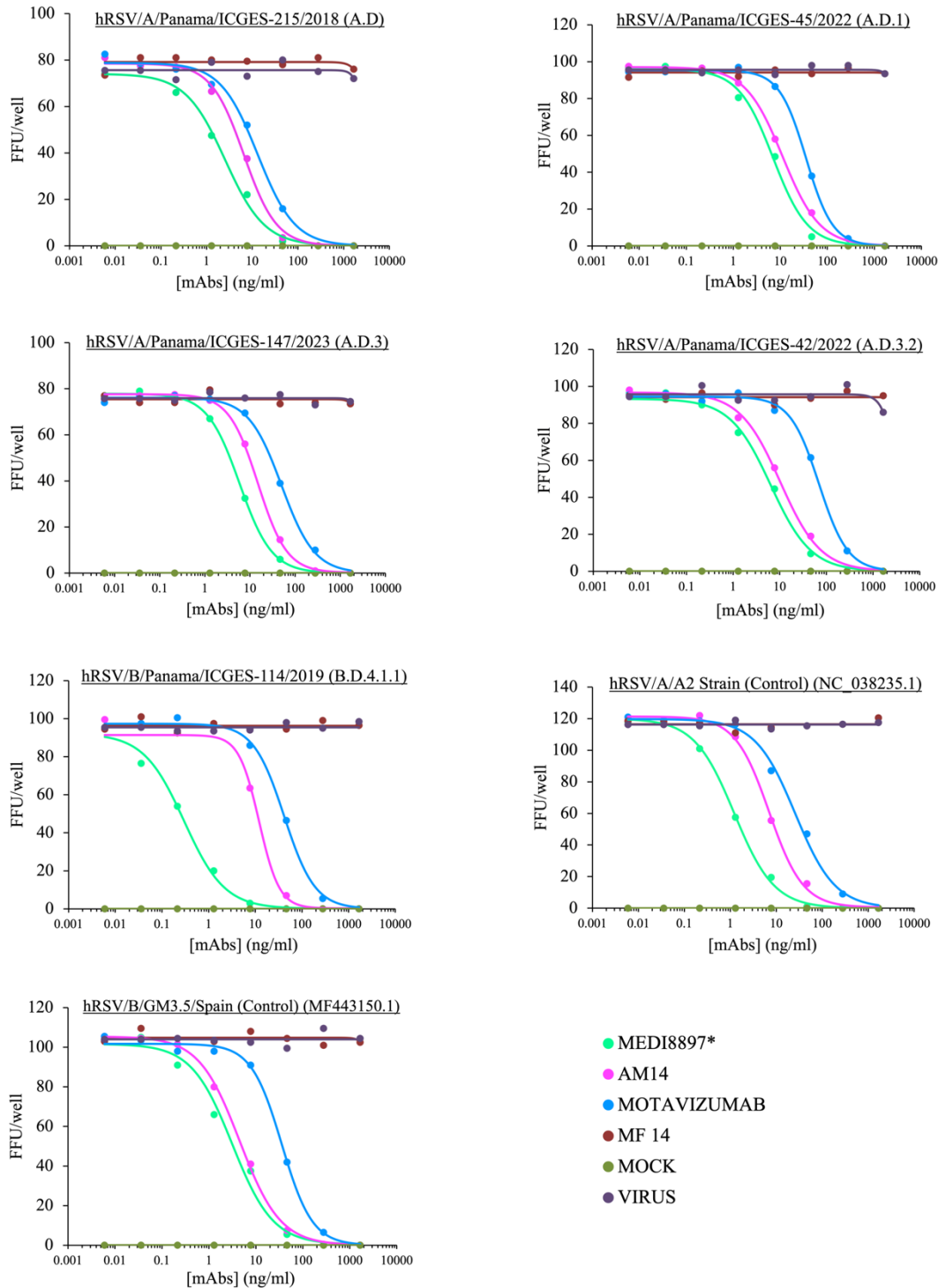


Figure II: Determination of IC₅₀ values for RSV isolates. Each graph corresponds to a specific strain, indicated at the top of each plot. Neutralization assays were performed using monoclonal antibodies (mAbs), with their respective concentrations (ng/mL) shown on the x-axis. The y-axis represents the number of FFU counted in each well. mAbs are color-coded as follows: MEDI8897* (turquoise), AM14 (magenta), MOTAVIZUMAB (blue) and MF 14 (green). IC₅₀ values were calculated by fitting the experimental data to a four-parameter logistic (4PL) equation using Microsoft Excel (Sebaugh, 2011). "hRSV", human Respiratory Syncytial Virus; "FFU", Focus Forming Units; "mAbs", Monoclonal Antibodies; "ng", Nanograms; "ml", Milliliters.

Statistical association analysis between the antigenic subgroups found and the
gender of the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Gender: (Male vs Female) for RSV Subgroups A vs B
for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018: [[6, 6], [4, 9]], Male vs Female, P-value: 0.5682

2019-20: [[31, 9], [25, 11]], Male vs Female, P-value: 0.5920

2021: [[0, 10], [0, 5]], Male vs Female, P-value: >0.9999

2022: [[34, 2], [26, 3]], Male vs Female, P-value: 0.7932

2023: [[19, 24], [12, 8]], Male vs Female, P-value: 0.3694

2024: [[30, 5], [21, 2]], Male vs Female, P-value: 0.8394

2018-2024: [[120, 56], [88, 38]], Male vs Female, P-value: 0.9840

There is no statistically significant association between the variables

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwoByTwo/TwoByTwo.htm>

Statistical association analysis between the antigenic subgroups found and the
clinical status of the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Clinical Status: (Hospitalized vs Outpatient) for RSV
Subgroups A vs B for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018: [[10, 15], [0, 0]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: >0.9999

2019-20: [[53, 17], [3, 2]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: 0.7487

2021: [[0, 4], [0, 11]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: >0.9999

2022: [[7, 2], [53, 3]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: 0.2747

2023: [[21, 18], [9, 13]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: 0.4822

2024: [[48, 7], [3, 0]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: >0.9999

2018-2024: [[139, 63], [68, 29]], Hospitalized vs Outpatient P-value: 0.9310

There is no statistically significant association between the variables

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>

Statistical association between the antigenic subgroups found and the Patient age
of the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Patient age, y: (<1 vs 1-4) for RSV Subgroups A vs B
for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018: [[9, 13], [1, 2]], Age group < 1 vs 1-4, P-value: >0.9999

2019-20: [[38, 16], [17, 4]], 2019-20 Age group < 1 vs 1-4, P-value: 0.5316

2021: [[0, 4], [0, 8]], Age group < 1 vs 1-4, P-value: >0.9999

2022: [[28, 2], [24, 3]], Age group < 1 vs 1-4, P-value: 0.8978

2023: [[14, 15], [9, 14]], Age group < 1 vs 1-4, P-value: 0.7065

2024: [[27, 3], [22, 4]], Age group < 1 vs 1-4, P-value: 0.8354

2018-2024: [[116, 53], [73, 35]], Age group < 1 vs 1-4, 0.9572

There is no statistically significant association between the variables

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>

Statistical association between the antigenic subgroups found and the Geographic

Area of the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Geographic Area: (MA&P vs The Rest of the Country)

for RSV Subgroups A vs B for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018: [[5, 5], [5, 10]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: 0.6748

2019-20: [[17, 6], [39, 14]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: >0.9999

2021: [[0, 9], [0, 6]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: >0.9999

2022: [[50, 4], [10, 1]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: >0.9999

2023: [[21, 10], [10, 23]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: 0.0056

2024: [[38, 6], [13, 1]], 2024 MA&P vs The Rest of the Country, P-value: 0.9123

2018-2024: [[131, 40], [77, 55]], 2024 MA&P vs The Rest of the Country, P-value:
0.001074

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>

Statistical association between the RSV-B lineages found and the Clinical Status of
the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Clinical Status: (Hospitalized vs Outpatient) for RSV
Lineages B.D.4.1.1 vs B.D.E.1 for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018-2024: [[22, 6], [3, 9]], Hospitalized vs Outpatient, P-value: 0.004456

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>

Statistical association between the RSV-B lineages found and the Geographic Area
of the patients

Fisher's Exact Test (p-value 2-tail)

Contingency tables (data) for Geographic Area: (MA&P vs The Rest of the Country)
for RSV Lineages B.D.4.1.1 vs B.D.E.1 for each epidemic outbreak (2018-2024)

2018-2024: [[5, 12], [21, 3]], MA&P vs The Rest of the Country, P-value: 0.0005

Analysis performed at <https://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>

FÍN