



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
FACULTAD DE MEDICINA

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DE LOS VIRUS DE  
LA GRIPE IDENTIFICADOS EN LA TEMPORADA GRIPAL 2024-2025**  
**ANALYSIS OF THE VIROLOGICAL CHARACTERISTICS OF INFLUENZA  
VIRUSES IDENTIFIED DURING THE 2024–2025 FLU SEASON**

Autor/a:

**Dª. Carolina García Briceño**

Tutor/es:

**Dª. Marta Hernández Pérez, D. Iván Sanz Muñoz**

TÍTULO: **Análisis de las características virológicas de los virus de la gripe identificados durante la temporada gripeal 2024-2025**

AUTOR/A: **Carolina García Briceño**

TUTOR/ES: **Marta Hernández Pérez, Iván Sanz Muñoz**

ÁREA/DEPARTAMENTO: **Departamento de APM**

---

## **TRIBUNAL**

---

PRESIDENTE: **D<sup>a</sup> Jose María Eiros Bouza (Dpto.)**

SECRETARIO: **D<sup>a</sup>. Sara Cuesta Sancho (Dpto.)**

VOCAL: **D<sup>a</sup>. Marta Hernández Pérez (Dpto.)**

SUPLENTE 1: **D<sup>a</sup>. Raquel Almansa Mora (Dpto.)**

SUPLENTE 2: **D. Marita Hernández Garrido (Dpto.)**

---

---

FECHA: 27/06/2025

CALIFICACIÓN:

---

## RESUMEN

Este trabajo evalúa la utilidad de la secuenciación genómica para la vigilancia virológica del virus de la gripe durante la temporada 2024-2025 en Castilla y León. Mediante el análisis de 384 muestras respiratorias, se aplicaron técnicas de RT-PCR y secuenciación NGS (Next Generation Sequencing) con tecnología Illumina NextSeq 550. Se identificaron los principales subtipos circulantes: H1N1, H3N2 y B/Victoria, con predominio del tipo A, en consonancia con la epidemiología estacional global. A través del análisis bioinformático con IRMA y FluSurver, se caracterizaron mutaciones relevantes en genes clave como neuraminidasa (NA), que se asocian algunas a resistencia antiviral.

El estudio mostró un alto rendimiento técnico, con un 88% de éxito en la secuenciación y una subtipificación precisa en el 89% de las muestras válidas. Las mutaciones H275Y, K360E y D432N fueron las principales candidatas vinculadas a resistencia a antivirales como Oseltamivir y Peramivir, lo que resalta la necesidad de mantener una vigilancia molecular activa. Los datos obtenidos aportan valor tanto para la detección temprana de variantes de interés como para la actualización de vacunas y recomendaciones terapéuticas.

El estudio mostró un alto rendimiento técnico, con un 88% de éxito en la secuenciación y una subtipificación precisa en el 89% de las muestras válidas. Las mutaciones H275Y, K360E y D432N fueron las principales candidatas vinculadas a resistencia a antivirales como Oseltamivir y Peramivir, lo que resalta la necesidad de mantener una vigilancia molecular activa. Los datos obtenidos aportan valor tanto para la detección temprana de variantes de interés como para la actualización de vacunas y recomendaciones terapéuticas.

## Palabras clave

Influenza, Influenza virus, Vacuna, Secuenciación NGS, Mutación.

## ***ABSTRACT***

This Final Degree Project evaluates the usefulness of genomic sequencing as a tool for virological surveillance of influenza viruses during the 2024–2025 flu season in Castilla y León. A total of 384 respiratory samples were analyzed using RT-PCR and Next Generation Sequencing (NGS) with the Illumina NextSeq 550 platform. The main circulating subtypes —H1N1, H3N2, and B/Victoria— were identified, with a predominance of type A viruses, consistent with global seasonal trends. Bioinformatic analysis with IRMA and FluSurver enabled the identification of key mutations in genes such as neuraminidase (NA) and hemagglutinin (HA), including several associated with antiviral resistance.

The study achieved a high technical performance, with an 88% sequencing success rate and accurate subtyping in 89% of successfully sequenced samples. Notably, the mutations H275Y, K360E, and D432N were identified as potential markers of resistance to antivirals like Oseltamivir and Peramivir, underscoring the importance of ongoing molecular surveillance. The generated data contribute to the early detection of relevant variants and support updates to vaccines and therapeutic guidelines.

In conclusion, this work demonstrates that integrating genomic sequencing into surveillance systems provides critical insights into influenza virus evolution, antiviral resistance, and public health strategy effectiveness. It highlights sequencing as an essential tool to anticipate future outbreaks and pandemics through real-time monitoring and evidence-based decision-making.

## ***Keywords***

*Influenza, Influenza virus, Vaccine, NGS sequencing, Mutation.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, Marta Hernández Pérez e Iván Sanz Muñoz, por su constante apoyo, implicación y dedicación durante el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado. Su guía y confianza han sido fundamentales en cada etapa del proyecto.

Agradezco también a todo el equipo del Centro Nacional de Gripe por acogerme y brindarme un entorno de trabajo tan enriquecedor. En especial, a mis compañeros de laboratorio Javi, Carla y Alejandro, por su compañerismo, paciencia y por estar siempre dispuestos a ayudar y compartir su conocimiento.

Mi gratitud también para Sonia, técnico de laboratorio del LUCIA, por su apoyo técnico y su disposición constante, sin la cual muchas fases del trabajo no habrían sido posibles.

Por último, gracias a mis compañeros de clase, cuyo apoyo, ánimo y colaboración han sido clave para que este proyecto saliera adelante. Su compañía ha hecho que este camino fuera mucho más llevadero y significativo.

## ÍNDICE

1. ABSTRACT
2. INTRODUCCIÓN
  - 2.1. Enfermedad de la gripe
    - 2.1.1. Contexto actual de la enfermedad
  - 2.2. Estructura molecular del virus
    - 2.2.1. Tipos y subtipos virales
    - 2.2.2. Genoma del virus
    - 2.2.3. Antigenic Drift y Antigenic Shift
  - 2.3. Antivirales
    - 2.3.1. Mecanismo de acción e importancia de los antivirales
    - 2.3.2. Tipos de antivirales
    - 2.3.3. Resistencia a antivirales
  - 2.4. Contexto histórico de la enfermedad e inicio de su vigilancia
  - 2.5. Redes de vigilancia en la actualidad
    - 2.5.1. Vigilancia global de la gripe
    - 2.5.2. Vigilancia de la gripe a nivel nacional
    - 2.5.3. Vigilancia de la gripe en Castilla y León
3. Hipótesis y objetivos
  - 3.1. Hipótesis y utilidad de la secuenciación en el estudio del virus de la gripe
  - 3.2. Objetivos
4. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 4.1. Recolección de muestras (RT-PCR CNGV)
  - 4.2. Secuenciación
    - 4.2.1. Extracción del material genético
    - 4.2.2. Preparación de la librería
    - 4.2.3. Carga de la librería y secuenciación
  - 4.3. Extracción y análisis de los datos obtenidos
    - 4.3.1. Análisis con IRMA
    - 4.3.2. Análisis de mutaciones con FluSurver
5. RESULTADOS
  - 5.1. RT-PCR CNGV
  - 5.2. Secuenciación Illumina NextSeq 550
    - 5.2.1. Extracción del material genético, calidad y concentración de muestras y librerías
    - 5.2.2. Secuenciación
  - 5.3. Distribución de subtipos virales

- 5.4. Distribución geográfica de las muestras
- 5.5. Análisis de mutaciones con FluSurver
- 6. DISCUSIÓN
  - 6.1. Rendimiento de la secuenciación
  - 6.2. Circulación de subtipos virales
  - 6.3. Análisis de mutaciones de neuraminidasa con FluSurver
  - 6.4. Mutaciones relacionadas con la resistencia antiviral
- 7. CONCLUSIONES
- 8. BIBLIOGRAFÍA
- 9. ANEXOS

## ABREVIATURAS

HA: Hemaglutinina

NA: Neuraminidasa

PB1: Polymerase Basic 1

PB2: Polymerase Basic 2

PA: Polymerase Acidic

NP: Nucleoproteína

NS1: Non-Structural protein 1

NEP: Nuclear Export Protein (también conocida como NS2)

M1/M2: Matriz proteica 1 / Canal iónico 2

NGS: Next Generation Sequencing (Secuenciación de nueva generación)

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR: Reverse Transcription quantitative PCR

CNGV: Centro Nacional de Gripe de Valladolid

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

OMS: Organización Mundial de la Salud

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

GISAID: Global Initiative on Sharing All Influenza Data

SiVIRA: Sistema de Vigilancia de Infección Respiratoria Aguda

SVGE: Sistema de Vigilancia de Gripe en España

GISRS: Global Influenza Surveillance and Response System

VIGIRA: Vigilancia Integrada de las Infecciones Respiratorias Agudas

FASTQ: Formato estándar de archivo para datos de secuenciación

IRMA: Iterative Refinement Meta-Assembler

CT: Cycle Threshold (umbral de ciclo en PCR)

HRI: Highly Reduced Inhibition

RI: Reduced Inhibition

S: Susceptible

## 1. Introducción

### 1.1. Enfermedad de la Gripe

#### 1.1.1. Contexto actual de la enfermedad

La gripe es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada por virus de la familia *Orthomyxoviridae*, y se clasifica en 4 tipos: A, B, C y D. Este virus se transmite entre personas a través de partículas respiratorias, y su presentación clínica puede variar desde síntomas leves hasta formas graves que requieren hospitalización, especialmente en grupos vulnerables como niños, personas mayores y pacientes inmunocomprometidos. Los virus de la gripe tipo A presentan una mayor diversidad genética y son responsables tanto de las epidemias estacionales como de las pandemias, mientras que los tipo B suelen estar restringidos al ser humano y causan brotes más localizados.(1)

A nivel mundial, la gripe representa una carga significativa para la salud pública. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), causa entre 3 y 5 millones de casos graves cada año, y provoca entre 290.000 y 650.000 muertes anuales por enfermedades respiratorias asociadas (1). Estos datos reflejan su impacto sanitario y socioeconómico, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (2).

Una de las principales amenazas que representa la gripe es su potencial pandémico. El virus de la gripe A tiene una elevada tasa de mutación debida a la baja fidelidad de su ARN polimerasa, lo que facilita la aparición de nuevas variantes antigenicas (deriva antigenica). Además, su genoma segmentado permite el reordenamiento genético (shift antigenico) cuando coexisten diferentes cepas en un mismo huésped, lo que puede dar lugar a virus totalmente nuevos frente a los cuales la población no posee inmunidad previa. Este fenómeno es especialmente preocupante cuando ocurre un salto entre especies, como desde aves o cerdos al ser humano, lo cual puede desencadenar una nueva pandemia, como ocurrió en 2009 con el virus A(H1N1)pdm09 (3), (4).

Dada su capacidad de adaptación y propagación, el control de la gripe requiere una vigilancia epidemiológica continua a nivel nacional e internacional. Esta vigilancia permite identificar nuevas variantes, evaluar la efectividad vacunal y actualizar anualmente las cepas incluidas en las vacunas. Además, es esencial para activar medidas de respuesta rápida en caso de una amenaza pandémica, lo que justifica la existencia de redes de vigilancia como el Sistema Mundial de Vigilancia y Respuesta a la Gripe de la OMS (GISRS) y sus homólogos nacionales (2), (5).

## 1.2. Estructura molecular del virus

### 1.2.1. Tipos y subtipos virales

Los virus de la gripe se clasifican en cuatro tipos: A, B, C y D. De estos, los tipos A y B son responsables de las epidemias estacionales en humanos. El virus de la gripe A se subdivide en subtipos según las combinaciones de dos glicoproteínas de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, se han identificado 18 subtipos de HA y 11 de NA, lo que da lugar a múltiples combinaciones. Sin embargo, solo algunos subtipos, como H1N1 y H3N2, han demostrado capacidad para causar epidemias importantes en humanos (6). Estas diferencias se deben principalmente a variaciones estructurales en HA y NA, que afectan su reconocimiento por el sistema inmune y la eficacia de las vacunas (4), (5).

### 1.2.2. Genoma del virus

El virus de la gripe A presenta un genoma segmentado de ARN de sentido negativo compuesto por ocho segmentos, los cuales codifican al menos diez proteínas esenciales para su replicación y patogenicidad (5):

1. **PB2:** subunidad de la ARN polimerasa viral; esencial para la transcripción del ARN viral.  
Tamaño aproximado (nt): 2.341.
2. **PB1:** subunidad central de la polimerasa; codifica también PB1-F2, implicada en la apoptosis. Tamaño aproximado (nt): 2.341.
3. **PA:** componente con actividad endonucleasa, necesario para la transcripción del ARN viral. Tamaño aproximado (nt): 2.233.
4. **HA (hemaglutinina):** proteína de superficie que permite la entrada viral mediante unión a receptores de ácido siálico. Tamaño aproximado (nt): 1.778.
5. **NP (nucleoproteína):** protege el ARN viral y forma parte del complejo ribonucleoproteico. Tamaño aproximado (nt): 1.565.
6. **NA (neuraminidasa):** facilita la liberación de nuevos viriones al cortar residuos de ácido siálico. Tamaño aproximado (nt): 1.413.
7. **M1/M2:** M1 forma la matriz estructural; M2 es un canal iónico implicado en la entrada del virus. Tamaño aproximado (nt): 1.027.
8. **NS1/NEP:** NS1 modula la respuesta inmune del hospedador; NEP facilita la exportación del ARN viral del núcleo (5). Tamaño aproximado (nt): 890.

Estas proteínas estructurales y no estructurales están altamente conservadas en los virus tipo A, aunque pueden presentar diferencias significativas en su secuencia entre subtipos, contribuyendo a su diversidad antigenica y capacidad de evasión inmunológica.

### **1.2.3. Antigenic Drift y Antigenic Shift**

La elevada tasa de evolución del virus de la gripe se explica por dos mecanismos principales:

- **Deriva antigenica (antigenic drift):** se refiere a la acumulación progresiva de mutaciones puntuales en los genes HA y NA. Estas mutaciones pueden modificar epítopos clave y reducir la eficacia de la inmunidad adquirida o vacunal, lo que provoca epidemias estacionales recurrentes (5), (6).
- **Cambio antigenico (antigenic shift):** es un proceso más abrupto, característico del virus de la gripe A, en el que se produce un reordenamiento genético cuando un hospedador (como un cerdo o ave) es coinfectado por dos subtipos distintos. El intercambio de segmentos genéticos puede dar lugar a un nuevo subtipo con potencial pandémico, frente al cual la población humana carece de inmunidad preexistente (3), (4), (5).

Estos mecanismos explican tanto la necesidad de una vigilancia virológica constante como la posibilidad real de que surja una nueva pandemia gripal.

## **1.3. Antivirales**

### **1.3.1. Mecanismo de acción e importancia de los antivirales**

Los antivirales utilizados en el tratamiento de la gripe son medicamentos diseñados específicamente para combatir el virus de la influenza. A diferencia de los antibióticos, que actúan contra bacterias, los antivirales interfieren directamente con el ciclo de vida de los virus, impidiendo su replicación y propagación en el organismo (7). Estos medicamentos desempeñan un papel crucial en el manejo clínico de la enfermedad, ya que cuando se administran dentro de las primeras 48 horas tras el inicio de los síntomas, pueden acortar la duración del cuadro clínico, aliviar los síntomas y, especialmente, reducir el riesgo de complicaciones graves como neumonía, hospitalización o muerte. Este beneficio se acentúa en grupos vulnerables como niños pequeños, adultos mayores, mujeres embarazadas o personas con enfermedades crónicas. Además, los antivirales son útiles para contener brotes en entornos cerrados, como hospitales o residencias, y proteger a personas que no pueden ser vacunadas por contraindicación médica. En conjunto, los antivirales representan, junto con la vacunación, una de las estrategias farmacológicas más importantes para combatir la gripe, limitando su impacto en salud pública y reduciendo la propagación viral (8).

### **1.3.2. Tipos de antivirales**

Dependiendo del fármaco, el mecanismo de acción antiviral puede variar: algunos bloquean la entrada del virus en la célula, otros inhiben enzimas esenciales para su replicación, como la neuraminidasa (NA) o la ARN polimerasa viral, y algunos impiden la liberación de nuevas partículas virales desde células infectadas (9). Entre los antivirales más empleados se encuentran: Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, Laninamivir y Baloxavir marboxil.

Mientras que Baloxavir marboxil inhibe la síntesis del ARN viral desde una etapa más temprana, el resto son inhibidores de la neuraminidasa, y actúan bloqueando el sitio activo de la enzima, de forma que impiden que el virus libere nuevas partículas desde la célula infectada, y por tanto, que se propague en el interior del organismo. Aunque todos comparten el mismo mecanismo de acción, estos se diferencian en su vía de administración, farmacocinética y contexto clínico de su uso (10).

Oseltamivir se administra de forma oral y tiene una vida media de 6-10 horas. Es el más usado en tratamiento y profilaxis de la población en general por su vía oral fácil y disponibilidad. Peramivir se administra por vía intravenosa, con una vida media de alrededor de 20 horas. Además, su uso está reservado principalmente a tratamiento de casos graves u hospitalarios. Zanamivir y Laninamivir tienen estructuras similares (ambos derivados del ácido siálico) y se administran por inhalación, pero Laninamivir se diferencia por su acción prolongada con una vida media mayor a tres días, haciendo que su dosis sea única, en comparación con una vida media de entre 2.5-5 horas de Zanamivir. Laninamivir se usa comúnmente en tratamiento y profilaxis prolongada, mientras que Zanamivir se usa como alternativa para cepas resistentes a Oseltamivir, útil en casos leves o moderados.

### **1.3.3. Resistencia a antivirales**

Uno de los principales retos en el uso de antivirales es el desarrollo de resistencia. Esta ocurre cuando el virus sufre mutaciones genéticas que le permiten evadir el efecto del tratamiento. Las mutaciones pueden existir antes del tratamiento (resistencia primaria) o aparecer durante el mismo por presión selectiva (resistencia adquirida). La resistencia viral puede disminuir la eficacia terapéutica, dificultar el control de brotes y reducir el arsenal disponible, lo que representa una amenaza considerable dada la alta transmisibilidad del virus.

Las mutaciones que impulsan esta resistencia se generan principalmente por la baja fidelidad de la ARN polimerasa viral. Cuando afectan a genes que codifican proteínas diana como la neuraminidasa, pueden alterar su estructura y reducir la afinidad antiviral (10), (11). Por tanto, para evaluar la posible aparición de resistencia a antivirales, se realiza en las muestras

secuenciadas un estudio de las mutaciones en el gen de la neuraminidasa. Estos antivirales inhibidores de la neuraminidasa (NAIs), y su mecanismo de acción consiste en bloquear la enzima. Por tanto, las mutaciones en este gen pueden alterar la estructura del sitio activo o regiones cercanas, disminuyendo la afinidad de unión del antiviral y reduciendo su eficacia. Por ello el análisis de estas mutaciones permite identificar perfiles genéticos asociados a resistencia conocida o potencial, y constituye una herramienta clave para la vigilancia molecular y la toma de decisiones terapéuticas en el contexto de la gripe.

En el anexo dos se muestran algunas de las mutaciones que tienen evidencia de reducir la sensibilidad contra alguno de los antivirales.

Factores como el uso inadecuado o prolongado de antivirales (12), la transmisión de cepas resistentes, o la recombinación genética entre diferentes cepas (11), contribuyen a la expansión de estos perfiles de resistencia.

Las consecuencias clínicas incluyen fallos terapéuticos, mayor riesgo de complicaciones, menor eficacia vacunal por deriva antigenica, y limitación de las alternativas farmacológicas, especialmente en el caso de resistencia cruzada (10). Por ello, se hace indispensable implementar estrategias como la vigilancia genómica continua, el uso racional de antivirales, el desarrollo de fármacos multidiana, y la actualización anual de las vacunas en base de datos moleculares y epidemiológicos actualizados.

#### **1.4. Contexto histórico de la enfermedad e inicio de su vigilancia**

La vigilancia de la gripe a nivel mundial tiene sus raíces en la pandemia de gripe española de 1918, que reveló la necesidad de monitorear este virus para prevenir futuras crisis sanitarias. La identificación de los primeros virus de la gripe en humanos en los años 30 permitió avances científicos, especialmente en el desarrollo de vacunas. Sin embargo, el brote de 1947 evidenció la variabilidad del virus, lo que reforzó la urgencia de una vigilancia internacional (13).

En respuesta, la OMS estableció en 1947 el primer comité especializado en gripe, dando origen al Centro Mundial de Gripe en el Reino Unido. Este centro sentó las bases para la vigilancia global, promoviendo la estandarización de métodos y el intercambio de información entre países. En 1952, se formalizó el sistema con la creación de la Red Mundial de Vigilancia de la Gripe, hoy conocida como GISRS (Global Influenza Surveillance and Response System) (14).

Desde entonces, el GISRS ha jugado un papel crucial en la detección temprana y respuesta ante

pandemias como las de 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2), facilitando el desarrollo rápido de vacunas y estrategias de control (13), (15). A partir de los años 60, la OMS inició reuniones anuales para actualizar la composición de las vacunas estacionales, en función de las variantes detectadas.

En la actualidad, esta red sigue siendo esencial en la vigilancia epidemiológica, permitiendo la identificación de nuevas cepas, el monitoreo de cambios genéticos y la rápida respuesta a posibles amenazas pandémicas, asegurando una protección efectiva a nivel global (14), (15).

## **1.5. Redes de vigilancia en la actualidad**

### **1.5.1. Vigilancia global de la gripe**

Actualmente, la vigilancia de la gripe a nivel global se realiza de forma coordinada por diversas organizaciones internacionales, con el objetivo de monitorear la circulación del virus, detectar nuevas variantes y orientar la producción de vacunas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lidera este proceso a través del Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) (1).

Además, organismos como el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en EE.UU. contribuyen con estudios sobre la evolución del virus y estrategias de control (16).

La plataforma GISAID desempeña un papel clave al proporcionar acceso a secuencias genéticas del virus, facilitando el análisis de su variabilidad y la identificación de nuevas cepas. (17)

Los sistemas de vigilancia centinela, conformados por hospitales y clínicas, reportan casos de gripe y tendencias epidemiológicas, permitiendo una respuesta rápida ante brotes (18), (19).

Estos esfuerzos combinados aseguran una protección efectiva a nivel global y la adaptación de las estrategias de vacunación cada temporada.

### **1.5.2. Vigilancia de la gripe a nivel nacional**

La vigilancia de la gripe en España se organiza a través del Sistema de Vigilancia de Infección Respiratoria Aguda (SiVIRA), coordinado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) mediante el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y el Centro Nacional de Microbiología (CNM) (20).

Este sistema se implementó en la temporada 2020-2021, siguiendo las recomendaciones del Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC) y la Organización Mundial de la Salud

(OMS) (21).

SiVIRA combina la vigilancia de Infección Respiratoria Aguda leve (IRAs) en Atención Primaria y la de Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) en hospitales, evolucionando a partir del Sistema de Vigilancia de Gripe en España (SVGE) (22). Su objetivo es establecer una vigilancia respiratoria integral y duradera, capaz de detectar diversos virus respiratorios y posibles patógenos emergentes.

Este sistema permite monitorizar la evolución de epidemias de gripe, COVID-19 y virus respiratorio sincitial (VRS), identificando patrones anómalos y evaluando la efectividad de las vacunas (23).

### **1.5.3. Vigilancia de la gripe en Castilla y León**

La vigilancia de la gripe en Castilla y León se enmarca en el Programa de Vigilancia Integrada de las Infecciones Respiratorias Agudas (VIGIRA), coordinado por la Dirección General de Salud Pública de la Junta de Castilla y León. Este programa tiene como objetivo monitorizar la circulación de virus respiratorios, incluyendo la gripe, SARS-CoV-2 y el virus respiratorio sincitial (VRS), mediante una red centinela que abarca tanto la atención primaria como la hospitalaria (24).

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1. Hipótesis y utilidad de la secuenciación en el estudio del virus de la gripe**

La secuenciación genética es una herramienta clave en la vigilancia virológica moderna, ya que permite obtener información detallada sobre el material genético de los virus circulantes. En el caso del virus de la gripe, esta técnica facilita la caracterización genética de los distintos subtipos, permitiendo la identificación precisa de variantes y la detección de mutaciones en genes clave como los que codifican las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (5), (6).

El análisis genómico a partir de la secuenciación proporciona datos fundamentales para el control epidemiológico, ya que permite monitorizar la evolución del virus en tiempo real, identificar eventos de deriva o cambio antigénico y detectar la aparición de cepas con características que puedan implicar mayor transmisibilidad, virulencia o escape inmunológico (3), (25).

Además, la secuenciación desempeña un papel central en la selección de cepas para las vacunas estacionales. Dado que las vacunas contra la gripe deben actualizarse anualmente, los datos obtenidos de la caracterización genética mundial permiten a la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitir recomendaciones precisas sobre qué variantes deben incluirse en la formulación

vacunal de cada hemisferio (5). De esta forma, la secuenciación contribuye a mejorar la eficacia vacunal y a anticiparse a posibles brotes o pandemias.

## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Objetivo general

- Evaluar la utilidad de la secuenciación genómica como herramienta para la vigilancia virológica del virus de la gripe durante la última temporada epidémica.

### 2.2.2. Objetivos específicos

- Analizar la evolución de la proporción relativa de los diferentes subtipos del virus de la gripe A y B circulantes durante la temporada 2024–2025.
- Identificar y describir las mutaciones genéticas observadas en las regiones codificantes de las proteínas HA y NA, especialmente aquellas asociadas con variaciones antigenicas o funcionales.
- Detectar, mediante el análisis de las secuencias obtenidas, la presencia de mutaciones en el gen NA que hayan sido descritas previamente como causantes de resistencia a antivirales, con el fin de evaluar su prevalencia y relevancia clínica durante el periodo de estudio.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Recolección de muestras (RT-PCR CNGV)

Para la detección y caracterización del virus de la gripe A y B se empleó la técnica de RT-qPCR (Real-Time Reverse Transcription PCR) siguiendo el protocolo establecido por el Centro Nacional de Gripe de Valladolid (CNGV). Esta técnica permite la identificación cualitativa in vitro del virus en muestras respiratorias mediante sondas de hidrólisis (TaqMan), basadas en la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa.

El ensayo utilizó el panel de primers y sondas del CDC (Influenza Virus Real-Time RT-PCR Panel, RUO), diseñado para la detección de gripe A (subtipos AH1, AH3, AH5, AH7, AH9) y gripe B (linajes Victoria y Yamagata). Para la amplificación se emplearon los reactivos SuperScript III Platinum One-Step Quantitative Kit (Invitrogen, Ref. 11745) o TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Ref. 4444434). Las reacciones se llevaron a cabo en placas blancas de 96 pocillos (LightCycler® 480), selladas con película adhesiva, en condiciones de bioseguridad adecuadas.

El ARN viral se extrajo previamente y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El análisis se realizó en el contexto del sistema de vigilancia VIGIRA, utilizando muestras centinela y hospitalarias recogidas durante la temporada epidemiológica vigente.

### **3.2. Secuenciación NGS**

#### **3.2.1. Extracción del material genético**

Para la extracción automatizada se empleó el kit MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, diseñado para purificar ácidos nucleicos virales y bacterianos (ADN y ARN) y se utilizó el instrumento KingFisher™ Flex. El procedimiento se realizó a temperatura ambiente, y requirió de una preparación previa que incluye elaborar una disolución de etanol al 80% a partir de etanol puro, el cual se empleó en el lavado. También se preparó de forma previa la mezcla de bolas de unión (“binding bead mix”), para la cual se combinó solución de unión (“binding solution”) y bolas magnéticas. Como usamos un volumen de entrada de muestra estándar, para hacer esta mezcla añadimos 530  $\mu\text{L}$  de solución de unión y 20  $\mu\text{L}$  de bolas magnéticas por muestra. La mezcla se agitó suavemente por inversión evitando formar burbujas. Se le dio importancia a agitar enérgicamente las bolas magnéticas antes de usarlas para garantizar una mezcla homogénea y obtener una eficiencia óptima.

En total se necesitaron 6 placas: 1 para las muestras, 3 de lavado, 1 de elución y 1 para las puntas. En las tres placas de lavado se añadió: 1 mL de wash buffer en la primera, 1 mL de etanol al 80% en la segunda y 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 80% en la tercera. En la placa de las muestras añadimos primero 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a cada pocillo, después añadimos 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra y, finalmente, 550  $\mu\text{L}$  de la mezcla de bolas de unión (“binding bead mix”) en cada pocillo.

Tras tener todas las placas listas, se colocaron en el instrumento según las posiciones que indica el manual. Finalmente, se ejecuta el programa MVP\_Flex, que tiene una duración de 27 minutos. Una vez finalizado, se retiró la placa de elución y se transfirió el eluido a una placa que se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la preparación de la librería.

#### **3.2.2. Preparación de la librería**

Para preparar esta librería se siguió el protocolo IMAP Flu (Illumina Microbial Amplicon Prep). Tras la extracción del material genético, se realizó la retrotranscripción de ARN a ADNc. A continuación, se realizó una amplificación específica por PCR de los segmentos virales utilizando cebadores dirigidos a las regiones conservadas del genoma del virus. Una vez obtenidos los amplicones, estos se someten a una segunda PCR para incorporar índices (“barcodes”) y adaptadores compatibles con las plataformas de secuenciación Illumina, lo que permite la multiplexación de múltiples muestras en una sola corrida. Posteriormente, se realizó una purificación con bolas magnéticas para eliminar fragmentos no deseados como cebadores libres,

nucleótidos y enzimas. Las librerías se cuantificaron, y finalmente se agruparon antes de ser cargadas en el secuenciador.

### **3.2.3. Carga de la librería y secuenciación**

Una vez finalizadas las fases de preparación, cuantificación y normalización de las librerías, se utilizó el cartucho correspondiente específico al modelo de secuenciador (NextSeq), las librerías agrupadas (pooled) en tubos etiquetados, ajustadas a las concentraciones requeridas por la plataforma y el formulario o archivo digital de configuración de la ejecución (Hoja de muestra) previamente generado.

En el laboratorio se realizó la carga manual de las muestras dentro del cartucho, depositando el volumen adecuado de la librería combinada en los reservorios indicados, evitando crear burbujas o contaminación cruzada entre muestras.

Tras introducir el cartucho en el equipo, se ejecutó el análisis desde el panel de control del secuenciador, seleccionando el modo de lectura y parámetros preestablecidos. Al ser el NextSeq, las secuencias se realizaron en modo lectura única de  $1 \times 75$  ciclos.

Durante la ejecución del run, el propio equipo llevó a cabo la clustering, amplificación en puente y lectura de bases, de forma automatizada y bajo un entorno controlado.

Una vez completada la secuenciación, los datos se almacenaron temporalmente en servidores locales del hospital, desde donde se descargaron los archivos FASTQ correspondientes. A partir de esos datos se llevaron a cabo los análisis posteriores, como alineamientos, detección de variantes, análisis de mutaciones, etc.

## **3.3. Extracción y análisis de los datos obtenidos**

### **3.3.1. Análisis con IRMA**

Tras la secuenciación de las muestras de virus influenza mediante la herramienta Illumina NextSeq 550, los archivos FASTQ obtenidos fueron analizados utilizando la herramienta IRMA (Iterative Refinement Meta-Assembler), desarrollada por los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) para el ensamblaje y análisis de genomas virales. El flujo de trabajo incluyó la depuración de lecturas, su alineamiento iterativo contra genomas de referencia específicos del subtipo viral, y la generación de secuencias consenso en formato FASTA. IRMA permitió obtener el genoma e identificar variantes de nucleótido único (SNVs), así como inserciones y delecciones, aplicando filtros de calidad que consideraban una frecuencia mínima del 50% y una cobertura superior a 100 lecturas. Los resultados permitieron obtener las secuencias consenso de cada segmento viral y un listado detallado de variantes, lo cual facilitó el análisis genotípico y la detección de mutaciones relevantes (26).

Tras este análisis se obtuvo datos como las secuencias FASTA, las variantes, las delecciones y las inserciones de todas las muestras analizadas.

### **3.3.2. Análisis de mutaciones con FluSurver**

Una vez obtenidas las secuencias consenso en formato FASTA para cada segmento del virus influenza mediante IRMA, se empleó la plataforma en línea FluSurver (GISAID) para llevar a cabo el análisis de mutaciones. IRMA genera automáticamente un archivo consensus.fasta por cada segmento viral, a partir del cual se pueden realizar comparaciones con bases de datos de referencia (26), (27).

Una vez introducidas las secuencias FASTA en FluSurver, la herramienta detecta sustituciones, inserciones y delecciones al comparar con referencias específicas de cada subtipo viral, y realiza además un análisis funcional para determinar si alguna mutación ha sido asociada previamente a resistencia a antivirales como Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir o Laninamivir (28). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron exclusivamente aquellas mutaciones que afectaban el gen de neuraminidasa (NA), con el objetivo de evaluar su potencial implicación en resistencia antiviral.

En el análisis de resistencia antiviral se utilizó un enfoque combinado para identificar mutaciones relevantes en el gen de la neuraminidasa. En primer lugar, en el anexo dos se representa una tabla con mutaciones de referencia, y se empleó un script en Python que comparó todas las mutaciones detectadas en las secuencias de NA de las muestras con una tabla de referencia de mutaciones asociadas a resistencias basada en literatura científica, con el objetivo de identificar coincidencias. Posteriormente, se exportaron los resultados obtenidos con la herramienta FlusSurver (GISAID), que proporciona un análisis funcional de las mutaciones. Se filtraron aquellas muestras que, según FluSurver, presentaban mutaciones con evidencia experimental o bibliográfica de inducir resistencia a NAIs. A partir de este subconjunto de muestras, se evaluó el conjunto completo de mutaciones presentes en cada una para identificar cuál de ellas era la probable responsable de la resistencia observada. Este procedimiento permitió realizar una validación cruzada entre los datos experimentales y la evidencia computacional obtenida.

## **4. Resultados**

### **4.1. RT-PCR CNGV**

En el anexo 1 se muestra el número y porcentaje de muestras cuyo CT era menor de 30, muestras que superan el valor de 30, muestras de las cuales obtuvimos un valor de 0 y, por último, muestras de las cuales no hemos realizado la técnica y por tanto desconocemos el valor de su CT. 67 muestras tenían un CT de menos de 30 y 94 tenían CT mayores de 30.

## **4.2. Secuenciación Illumina NextSeq 550**

### **4.2.1. Extracción del material genético, calidad y concentración de muestras y librerías**

En el anexo 3 se muestra la tabla se resumen los parámetros del proceso de secuenciación llevado a cabo. Se utilizaron 384 muestras distribuidas en cuatro placas, cada una compuesta por muestras de virus de la gripe, y se siguió una cronología estándar que incluyó extracción de ARN, síntesis de ADNc, preparación de librería, pooling y carga en el secuenciador Illumina NextSeq 550. Las concentraciones finales del pool oscilaron entre 58,5 y 100 ng/ $\mu$ L, y la mezcla se cargó ajustada a aproximadamente 1,24 ng/ $\mu$ L para alcanzar una densidad de clúster final de 169 K/mm<sup>2</sup>. Este valor se encuentra dentro del rango recomendado para corridas de tipo mid-output en NextSeq (aproximadamente 170-220 K/mm<sup>2</sup>), lo que favorece un equilibrio óptimo entre rendimiento y calidad de lectura (29), manteniendo altas puntuaciones Q30 y evitando problemas relacionados con infra- o sobrecarga de librería.

### **4.2.2. Secuenciación**

De las 384 muestras secuenciadas, se obtuvo la secuencia parcial o completa de 339 muestras, lo que representa un porcentaje del 88%. De estas, fue posible subtipar con los datos de secuencia a 302 muestras, siendo estas el 89% de las secuenciadas exitosamente, mientras que en 37 no se logró una clasificación completa. En 18 de las 37 muestras no subtipadas se disponía del valor de CT de la RT-PCR diagnóstica previa, observándose que 14 tenían valores superiores a 30, reflejando una carga viral baja; las cuatro restantes presentaron valores entre 26,48 y 28,74.

## **4.3. Distribución de subtipos virales**

En el anexo 4 se muestra la gráfica con las proporciones de los subtipos obtenidos. Entre las muestras secuenciadas se identificaron cuatro grupos principales: H3N2 (112 muestras), H1N1 (100 muestras, tipo B Victoria (90 muestras) y FAILED (45 muestras no tipables). Este predominio de virus de tipo A (H3N2 y H1N1) sobre los de tipo B coincide con la epidemiología estacional descrita por organismos como la OMS y el CDC, que destacan que los subtipos A(H1N1) y A(H3N2) circulan más interesantemente en humanos y causan la mayoría de las epidemias gripales en la mayoría de las temporadas (1), (30).

Además, estudios previos han observado que la co-circulación de estos subtipos suele mostrar una mayor carga epidemiológica para la salud pública, siendo H3N2 especialmente prevalente en numerosos ciclos anuales (31), (32).

#### **4.4. Distribución geográfica de las muestras**

La mayoría de las muestras procedían de Salamanca (102), Valladolid (56) y León (44). También destacaron Burgos (38), Zamora (36) y Palencia (34). Provincias como Ávila, Segovia y Soria participaron en menor medida, reflejando una distribución geográfica diversa dentro de Castilla y León y una amplia cobertura de vigilancia regional.

#### **4.5. Análisis de mutaciones con FluSurver**

Los resultados del análisis de mutaciones con FluSurver revelan una gran carga mutacional considerable en las muestras, sumando más de 16 millones de mutaciones entre todas ellas, con una media aproximada de 6.950 mutaciones por muestra. Entre los genes analizados, la hemaglutinina (HA) acumuló un total de más de 2,2 millones de mutaciones, superando la media general y reflejando su alta variabilidad y precisión selectiva, dado su papel clave en el reconocimiento de células huésped (32). La neuraminidasa (NA), aunque con menor carga total alrededor de 778.000 mutaciones, también mostró una variabilidad destacada (31).

Del total de secuencias analizadas en el gen NA, 1979 muestras presentaron al menos una mutación, mientras que solo 50 muestras mostraron secuencias idénticas a la cepa de referencia, lo que representa una tasa de mutación del 97,53% para este gen. La media de mutaciones por muestra en NA se mantiene elevada, lo que evidencia la alta variabilidad genética de esta proteína en circulación (31).

En cuanto al análisis comparativo de mutaciones con la tabla de mutaciones con evidencia de provocar resistencia, no se encontró ninguna coincidencia entre estas y las mutaciones encontradas en FluSurver, por lo que únicamente se realizará el análisis de mutaciones de resistencias con aquellas que han sido detectadas por FluSurver.

En la plataforma de FluSurver se identificaron varias muestras con mutaciones asociadas a resistencia antiviral. En H1N1pdm09, la muestra FLU0878 presentó las mutaciones S52N, S200N, V234I, I264T, H275Y y F322L, siendo la H275Y la principal responsable de esta resistencia (33).

En el linaje B Victoria, se detectaron los perfiles mutacionales:

- **FLU0833 y FLU0958:** L52S, K360E, G378E, V395I e I459V.
- **FLU0857:** L52S, G378E, D432N, G452X e I459V

- **FLU0941:** K360E, R363X, W364X, Y365X, S366X, R367X, T372X, E373X, R374X, G378E, A389X, D390X, S391X, D392X, A393X, L394X, T395X, F396X, S397X, G398X, V399X, M400X, V401X, S402X, M403X.

Entre estas, **K360E** y **D432N** fueron las mutaciones asociadas a ganancia de resistencia antiviral. En la última muestra observamos múltiples mutaciones truncantes en la región C-terminal.

## 5. Discusión

### 5.1. Rendimiento de la secuenciación

El porcentaje de éxito del 88% en la obtención de secuencias completas o parciales demuestra una elevada eficiencia del flujo de trabajo. El valor de densidad de clúster alcanzado (169 K/mm<sup>2</sup>) se sitúa dentro del rango óptimo recomendado para la plataforma Illumina NextSeq 550 en corridas de tipo mid-output (170-220 K/mm<sup>2</sup>), lo que confirma una adecuada concentración de carga y preparación de librerías, favoreciendo un equilibrio entre rendimiento y calidad de lectura. Estos parámetros técnicos fueron determinantes para lograr datos de alta calidad y permiten una subtipificación fiable en cerca del 90% de las muestras.

La fracción de muestras no subtipadas (11%) se asocia en gran medida con una baja carga viral, como indican los valores altos de CT, lo que es consistente con estudios previos que muestran una caída significativa en el éxito de la secuenciación en muestras con CT altos (>30) (34).

Este hallazgo pone de manifiesto la relevancia del CT como criterio previo para seleccionar las muestras más prometedoras para secuenciación y subraya la importancia de minimizar los tiempos desde la toma de muestra hasta la extracción, así como garantizar condiciones óptimas de conservación para preservar la calidad del RNA viral.

### 5.2. Circulación de subtipos virales

Los resultados muestran una mayor prevalencia de los subtipos H3N2 y H1N1, en consonancia con las tendencias nacionales observadas durante la temporada analizada, donde los virus A(H1N1)pdm09 y A(H3N2) fueron los subtipos A predominantes circulantes (1), (35). Esta predominancia de virus de tipo A puede explicarse por su mayor capacidad de mutación, su facilidad de transmisión y su capacidad para evadir la respuesta inmune, especialmente en un contexto post-pandémico con cambios significativos en la inmunidad de grupo tras el brote de 2009-2010 (35), (36).

El subtipo B, aunque menos frecuente, sigue representando una proporción significativa de los casos y no debe ser ignorado en las estrategias de prevención y vacunación, ya que su circulación también contribuye al impacto sanitario general (37).

### **5.3. Análisis de mutaciones de NA con FluSurver**

La muestra con ID FLU0864\_NA presentó la mayor cantidad de mutaciones en NA, lo que podría indicar una evolución adaptativa acelerada o incluso artefactos técnicos derivados de la secuenciación o anotación. En contraste, FLU0839\_NA mostró la menor carga mutacional en NA, posiblemente reflejando una cepa más conservada o una mejor integridad del RNA viral.

Estas diferencias en carga mutacional pueden explicarse por múltiples factores: el origen geográfico y temporal de las muestras, la calidad del RNA extraído, la cobertura de secuenciación, o variaciones en la presión inmunitaria del huésped. Algunas muestras podrían corresponder a variantes genéticamente estables, mientras que otras estarían evolucionando rápidamente para evadir la respuesta inmune o adaptarse a nuevos hospedadores. CITA 35

### **5.4. Mutaciones relacionadas con la resistencia antiviral**

La ausencia de coincidencias entre las mutaciones detectadas en las muestras analizadas y las incluidas en la tabla de referencia puede deberse a varios factores. En primer lugar, la tabla utilizada se centraba en un conjunto limitado de mutaciones previamente descritas en la literatura como causantes de resistencia antiviral, lo que excluye posibles variantes emergentes o menos estudiadas, como las del linaje B de influenza. Además, algunas mutaciones pueden tener efectos contextuales o depender de combinaciones específicas con otras sustituciones para generar un fenotipo resistente, lo que no siempre está reflejado en bases de datos estándar y artículos. Por otro lado, la detección de tres mutaciones diferentes por parte de FluSurver sugiere que existen otros cambios estructurales o funcionales en la neuraminidasa que podrían estar relacionados con mecanismos de resistencia alternativos o poco caracterizados. Esto subraya la necesidad de mantener actualizadas las listas de mutaciones relevantes y de utilizar herramientas complementarias para la interpretación funcional de variantes, especialmente en un contexto de rápida evolución viral como el de la influenza.

Las tres mutaciones identificadas por FluSurver que han sido responsables de la ganancia de mutaciones en 5 de las muestras fueron H275Y, K360E y D432N.

La mutación H275Y afecta directamente al sitio activo de la enzima. Esta es la mutación clásica y mejor documentada asociada a resistencia a Oseltamivir en la neuraminidasa de H1N1. La presencia de H275Y reduce drásticamente la afinidad de la neuraminidasa por Oseltamivir, confiriendo resistencia clínica significativa. Además, esta mutación también puede conferir resistencia cruzada a Peramivir, aunque menos marcada que para Oseltamivir (38), (39), (40).

Este cambio, que sustituye una histidina por una tirosina, reduce el espacio disponible en el bolsillo de unión de la neuraminidasa. Como consecuencia, se ve afectada la interacción del antiviral con el sitio catalítico, especialmente en el caso de Oseltamivir y Peramivir. Estudios previos han documentado que esta mutación puede reducir la afinidad por Oseltamivir hasta 2.600 veces y por Peramivir en torno a 1.400 veces, aunque la enzima puede seguir siendo susceptible a Zanamivir debido a las diferentes características químicas de este último fármaco.

La mutación K360E, por su parte, no se localiza en el sitio activo de la neuraminidasa, pero se encuentra en una región estructuralmente cercana, el reemplazo de una lisina (carga positiva) por un ácido glutámico (carga negativa) puede inducir cambios alóstéricos que afecten la estabilidad del tetramero de la neuraminidasa o la conformación local necesaria para la correcta unión del antiviral. Aunque la evidencia sobre esta mutación es más limitada, estudios funcionales han sugerido que, en combinación con otras mutaciones, K360E puede reducir la susceptibilidad a múltiples NAIs. La organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado esta mutación como marcador potencial de susceptibilidad reducida, especialmente en ciertos linajes del virus influenza B (41), (42).

En el caso de D432N, se ha descrito como una mutación asociada directamente a resistencia a Peramivir. Este cambio afecta a un residuo conservado involucrado en una red de enlaces de hidrógeno clave para la integridad estructural del sitio activo de la NA. Su presencia puede alterar la configuración tridimensional de la enzima, disminuyendo la eficacia del antiviral. Además, se ha observado que, cuando D432N aparece junto con otras mutaciones como G378E, como ocurre en este caso, su efecto inhibidor sobre Peramivir se acentúa,

Estos hallazgos refuerzan la importancia de realizar un seguimiento genómica continuo de las mutaciones emergentes en genes diana como NA. La vigilancia de estos cambios permite no solo anticipar posibles fallos terapéuticos en el uso de antivirales, sino también adaptar las recomendaciones clínicas según los patrones de resistencia observados en el campo (43), (41).

En la muestra FLU0941, de influenza B, no se encontraron mutaciones de resistencia clásicas, pero sí alteraciones estructurales significativas como truncaciones múltiples, lo que sugiere un posible mecanismo de pérdida funcional de la NA.

En general, estos hallazgos reflejan la necesidad de mantener una vigilancia continua de las mutaciones emergentes en genes diana de antivirales, ya que permiten adaptar las recomendaciones terapéuticas y anticipar posibles fallos en los tratamientos (43), (44).

## 6. Conclusiones

Este trabajo ha demostrado la utilidad de la secuenciación genómica como herramienta esencial para la vigilancia del virus de la gripe en el ámbito regional de Castilla y León. Mediante el análisis de 384 muestras, se identificaron los principales subtipos circulantes, con predominio de H3N2 y H1N1, y se caracterizaron mutaciones relevantes en genes clave, como la neuraminidasa, incluyendo algunas asociadas a posibles mecanismos de resistencia antiviral (1), (31).

El elevado porcentaje de éxito en la secuenciación (88%) y la alta calidad de los datos, avalada por parámetros técnicos como la densidad de clúster, evidencian la fiabilidad y eficacia del protocolo empleado, validando el uso rutinario de la secuenciación en sistemas de vigilancia genómica (45).

Los resultados no solo reflejan las dinámicas virales observadas a nivel nacional durante la temporada 2024-2025, sino que también refuerzan la necesidad de mantener un sistema de vigilancia molecular continuo. Este enfoque permite detectar de manera temprana la aparición de variantes con implicaciones clínicas, guiar la toma de decisiones en salud pública y contribuir a la actualización eficaz de las vacunas estacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gripe (estacional) [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
2. Haider S, Hassan MZ. Seasonal influenza surveillance and vaccination policies in the WHO South-East Asian Region. *BMJ Glob Health* [Internet]. 12 de febrero de 2025 [citado 20 de junio de 2025];10(2). Disponible en: <https://gh.bmj.com/content/10/2/e017271>
3. Xiong W, Zhang Z. Influenza Virus Genomic Mutations, Host Barrier and Cross-species Transmission. *Curr Genomics*. 2025;26(3):161-74.
4. Influenza and Influenza Vaccine: A Review - Nypaver - 2021 - Journal of Midwifery & Women's Health - Wiley Online Library [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jmwh.13203>
5. Gripe (estacional) [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
6. CDC. Influenza (Flu). 2024 [citado 20 de junio de 2025]. How Flu Viruses Can Change: «Drift» and «Shift». Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/php/viruses/change.html>
7. ¿Qué es un antiviral? - NFID (en inglés) [Internet]. <https://www.nfid.org/>. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://es.nfid.org/resource/what-is-an-antiviral/>
8. Fuentes Ma. Antivirales: Todo lo que Necesitas Saber [Internet]. Enart Systems. 2024 [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://enartsystems.com/antivirales-todo-lo-que-necesitas-saber/>
9. Agut H. Antivirales (a excepción del virus de la inmunodeficiencia humana y la hepatitis). EMC - Tratado de Medicina. 1 de mayo de 2022;26(2):1-10.
10. Tratamiento de la influenza (gripe) - NFID [Internet]. <https://www.nfid.org/>. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://es.nfid.org/resource/influenza-flu-treatment/>
11. ¿Qué es la mutación viral, cómo mutan los virus y en qué afecta a las vacunas? | Pfizer España [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.pfizer.es/salud/enfermedades-y-patologías/covid-19/qu%C3%A9-es-la-mutaci%C3%B3n-viral-c%C3%B3mo-mutan-los-virus-y-en-qu%C3%A9-afecta-a-las-vacunas>
12. Ángeles Marcos M. Estudios de resistencia. ¿Cuándo están indicados? *Enferm Infect Microbiol Clin*. 1 de diciembre de 2011;29:24-7.
13. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network - Ziegler - 2018 - Influenza and Other Respiratory Viruses - Wiley Online Library [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/irv.12570>
14. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system>
15. Highly pathogenic avian influenza H5N1: history, current situation, and outlook | *Journal of Virology* [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jvi.02209-24>

16. Gripe – Epidemiología y situación mundial | Semevi [Internet]. 2025 [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://amse.es/gripe-epidemiologia-y-situacion-mundial/>
17. WHO-2019-nCoV-Adapting-GISRS-2020.1-spa.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340623/WHO-2019-nCoV-Adapting-GISRS-2020.1-spa.pdf>
18. Hernández M, García-Morán E, Abad D, Eiros JM, Hernández M, García-Morán E, et al. GISAID: iniciativa internacional para compartir datos genómicos del virus de la gripe y del SARS-CoV-2. Revista Española de Salud Pública [Internet]. 2021 [citado 20 de junio de 2025];95. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1135-57272021000100203&lng=es&nrm=iso&tlang=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1135-57272021000100203&lng=es&nrm=iso&tlang=es)
19. 3779667b-b63e-93aa-5ebd-020de734ec6c.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: [https://cne.isciii.es/documents/73819/400733/Sistemas+y+fuentes+de+informacion+del+SVGE\\_2020-21\\_vf.pdf/3779667b-b63e-93aa-5ebd-020de734ec6c](https://cne.isciii.es/documents/73819/400733/Sistemas+y+fuentes+de+informacion+del+SVGE_2020-21_vf.pdf/3779667b-b63e-93aa-5ebd-020de734ec6c)
20. Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://vgripe.isciii.es/inicio.do>
21. Sistemas y fuentes de informacion del SVGE\_2020-21\_vf.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: [https://vgripe.isciii.es/documentos/20202021/home/Sistemas%20y%20fuentes%20de%20informacion%20del%20SVGE\\_2020-21\\_vf.pdf](https://vgripe.isciii.es/documentos/20202021/home/Sistemas%20y%20fuentes%20de%20informacion%20del%20SVGE_2020-21_vf.pdf)
22. Vigilancia de la Gripe en España.
23. CNE [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. CNE - Sistema histórico de vigilancia de gripe. Disponible en: <https://cne.isciii.es/gripe-historico>
24. 2980515-Programa VIGIRA 2024-25.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/programa-vigilancia-integrada-ira-red-centinela-sanitaria-c.ficheros/2980515-Programa%20VIGIRA%202024-25.pdf>
25. Webster RG, Govorkova EA. H5N1 Influenza — Continuing Evolution and Spread. New England Journal of Medicine. 23 de noviembre de 2006;355(21):2174-7.
26. Shepard SS, Meno S, Bahl J, Wilson MM, Barnes J, Neuhaus E. Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler. BMC Genomics. 5 de septiembre de 2016;17(1):708.
27. Understanding and creating IRMA modules [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://wonder.cdc.gov/amd/flu/irma/modules.html>
28. BII Flusurver - Prepared for the next wave [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://flusurver.bii.a-star.edu.sg/>
29. NextSeq 550 System Specifications | Key performance parameters [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/specifications.html>
30. CDC. Influenza (Flu). 2024 [citado 20 de junio de 2025]. Types of Influenza Viruses. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses-types.html>

31. Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*. julio de 2015;523(7559):217-20.
32. Allen JD, and Ross TM. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 3 de agosto de 2018;14(8):1840-7.
33. Amarelle L, Lecuona E, Sznajder JI. Tratamiento antigripal: fármacos actualmente utilizados y nuevos agentes en desarrollo. *Archivos de Bronconeumología*. 1 de enero de 2017;53(1):19-26.
34. Cane J, Sanderson N, Barnett S, Vaughan A, Pott M, Kapel N, et al. Nanopore sequencing of influenza A and B in Oxfordshire and the United Kingdom, 2022–23. *Journal of Infection [Internet]*. 1 de junio de 2024 [citado 20 de junio de 2025];88(6). Disponible en: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(24\)00098-7/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(24)00098-7/fulltext)
35. Estimating the burden of seasonal influenza in Spain from surveillance of mild and severe influenza disease, 2010-2016 - Oliva - 2018 - Influenza and Other Respiratory Viruses - Wiley Online Library [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/irv.12499>
36. Antigenic drift and subtype interference shape A(H3N2) epidemic dynamics in the United States | eLife [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/91849>
37. Factsheet about seasonal influenza [Internet]. 2017 [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/factsheets/factsheet>
38. Jofré M L. Resistencia a inhibidores de neuraminidasa. *Revista chilena de infectología*. agosto de 2009;26(4):378-381.
39. revisionreina.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2008/03/revisionreina.pdf>
40. Salazar MI, López-Ortega O, León-Ávila G, Ramírez-González JE. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. 2010;146(3).
41. 1.-nai\_human\_reduced-susceptibility-marker-table-(who)\_07.03.23\_update.pdf [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/global-influenza-programme/1.-nai\\_human\\_reduced-susceptibility-marker-table-\(who\)\\_07.03.23\\_update.pdf](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/global-influenza-programme/1.-nai_human_reduced-susceptibility-marker-table-(who)_07.03.23_update.pdf)
42. Farrukee R, Leang SK, Butler J, Lee RTC, Maurer-Stroh S, Tilmanis D, et al. Influenza viruses with B/Yamagata- and B/Victoria-like neuraminidases are differentially affected by mutations that alter antiviral susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 de julio de 2015;70(7):2004-12.
43. Full article: Influenza neuraminidase mutations and resistance to neuraminidase inhibitors [Internet]. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2024.2429627>
44. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* [Internet]. 29 de enero de 2019 [citado 20 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00039/full>

45. Optimal cluster density guidelines for the NextSeq 500/550 | Illumina Knowledge [Internet]. 2024 [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en:  
<https://knowledge.illumina.com/instrumentation/nextseq-500-550/instrumentation-nextseq-500-550-troubleshooting-list/000002067>

## ANEXOS

Se encuentran ordenados las figuras y tablas que han sido referenciadas en el trabajo.

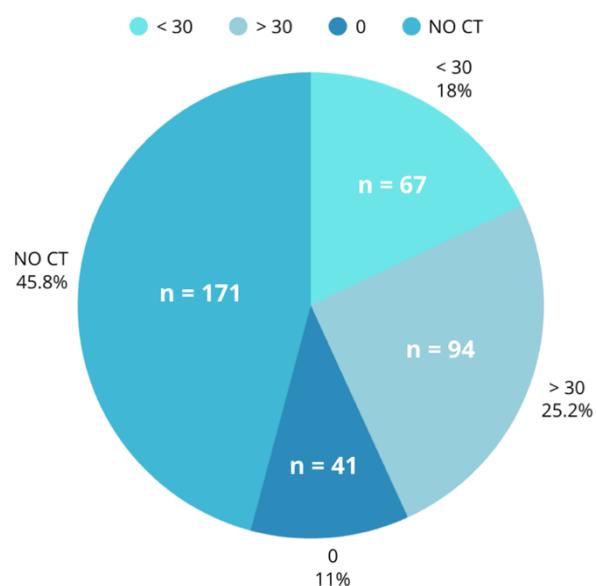
Declaración el uso de sistemas de IA:

En cumplimiento de los requisitos de honestidad académica, declaro que he hecho uso de sistemas de IA generativa (OpenAI – ChatGPT, y Perplexity AI) en las siguientes tareas del presente Trabajo de Fin de Grado:

1. Búsqueda de artículos científicos y fuentes bibliográficas relevantes.
2. Traducción de contenidos técnicos del inglés al español y viceversa.
3. Síntesis y resumen de información compleja para su mejor comprensión.

Todas las aportaciones obtenidas mediante estas herramientas han sido debidamente revisadas, contrastadas con fuentes científicas fiables y adaptadas por la autora, garantizando la veracidad y la integridad del trabajo presentado.

**Anexo 1: gráfica con las proporciones de los CT obtenidos en las pruebas de RT-PCR realizadas en el Centro Nacional de Gripe.**



**Anexo 2: tabla con las mutaciones de referencia encontradas para cada subtipo viral y la reducción de la sensibilidad que producían en los antivirales.**

Influenza subtype	NA mutation	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
A(H1N1)pdm09	N294S	HRI	S	RI
	H274Y	HRI	S	HRI
	S246N/H274Y	HRI	S	HRI
	I222V/H274Y	HRI	S	-
	I222R/H274Y	HRI	RI	HRI
	I222R	RI	RI	-
	E119G	S	HRI	RI
	E119V	RI	HRI	RI
A(H3N2)	N294S	HRI	S	-
	R292K	HRI	-	-
	Deletion 245–248	HRI	S	S
	D151A/D	S	HRI	-
	Q136K	S	RI	-
	E119V/I222V	HRI	S	S
	E119V	HRI	S	S
	R224K	HRI	HRI	-
	R371K	RI	RI	-
B	R731K	HRI	RI	-
	N294S	HRI	-	-
	D198N	HRI	HRI	S
	R152K	HRI	RI	HRI
	E119A	HRI	HRI	HRI
	E119D	HRI	HRI	HRI
	E119G	HRI	RI	HRI
	E119V	HRI	S	HRI
	R292K	RI	RI	HRI
	E105K	RI	S	
	H274Y	RI	S	RI
	I222T	RI	S	-

HRI: Highly Reduced Inhibition.

RI: Reduced Inhibition.

S: sensible.

**Anexo 3: tabla con la información de los procedimientos realizados en la preparación de la librería para la secuenciación**

LUCIA 2025	Especie	Fecha extracción ADN	Posición	Fecha librería	Concentración Pool	Fecha carga	Concentración carga	Cluster Densify
1-96	Gripe	29/04/2025	A1-H12	09/05/2025	58,5 ng/µL	16/05/2025		
97-192	Gripe	12/05/2025	A1-H12	14/05/2025	63,7 ng/µL	16/05/2025		
193-288	Gripe	12/05/2025	A1-H12	15/05/2025	90,8 ng/µL	16/05/2025		
289-373	Gripe	29/04/2025	A1-H12	09/05/2025	100 ng/µL	16/05/2025		

**Anexo 4: gráfica que representa las proporciones de los subtipos obtenidos en la secuenciación**



## CÓDIGO *scripts*

### Script Python

```

import pandas as pd

# Rutas de los archivos
archivo_origen =
"C:/Users/carolina_n6pnff4/Downloads/flusurver_result11822492.xlsx"
archivo_destino = "C:/Users/carolina_n6pnff4/Downloads/Mutaciones HA (1).xlsx"
archivo_salida =
"C:/Users/carolina_n6pnff4/Downloads/Mutaciones_HA_resultado.xlsx"

# Leer el origen y limpiar
df_flu = pd.read_excel(archivo_origen, sheet_name="HA")
df_flu.columns = ["Subtype", "Query", "total # mutations", "Mutation"]
df_flu = df_flu[df_flu["Subtype"] != "Subtype"] # eliminar cabecera errónea
df_flu["Mutation"] = df_flu["Mutation"].astype(str).str.strip()
df_flu["Query"] = df_flu["Query"].astype(str).str.strip()
df_flu["Subtype"] = df_flu["Subtype"].astype(str).str.strip()
df_flu["total # mutations"] = pd.to_numeric(df_flu["total # mutations"],
errors="coerce")

# Leer el destino y limpiar
df_mutaciones = pd.read_excel(archivo_destino)
df_mutaciones["HA mutation"] = df_mutaciones["HA
mutation"].astype(str).str.strip().str.replace("\u00A0", "", regex=False)
df_mutaciones["Subtipo"] =
df_mutaciones["Subtipo"].fillna(method='ffill').astype(str).str.strip()

# Resultado
total_mutaciones = []
ids_muestras = []

# Bucle principal
for _, row in df_mutaciones.iterrows():
    subtipo = row["Subtipo"]
    mutaciones = [m.strip() for m in row["HA mutation"].split("/")]

    # Filtrar por subtipo
    df_subtipo = df_flu[df_flu["Subtype"] == subtipo]

    # Encontrar muestras que tienen todas las mutaciones indicadas
    ids_validos = set(df_subtipo["Query"].unique())
    for mut in mutaciones:
        ids_con_mut = set(df_subtipo[df_subtipo["Mutation"] == mut]["Query"])
        ids_validos = ids_validos & ids_con_mut # intersección

    # Extraer total mutaciones por muestra
    suma_mutaciones =
df_subtipo[df_subtipo["Query"].isin(ids_validos)][["Query", "total #
mutations"]].drop_duplicates()

```

```
total = suma_mutaciones["total # mutations"].sum()

total_mutaciones.append(int(total) if not pd.isna(total) else 0)
ids_muestras.append(", ".join(sorted(ids_validos)))

# Añadir al DataFrame de destino
df_mutaciones["Total mutaciones en muestras con esa mutación"] =
total_mutaciones
df_mutaciones["IDs FLU con esa mutación"] = ids_muestras

# Guardar archivo
df_mutaciones.to_excel(archivo_salida, index=False)
print(f"✅ Resultado guardado como: {archivo_salida}")
```