








# PRIMERA DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD SUBTIPO H5N1 EN CUBA

## First detection of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Cuba

 Carmen Laura Perera González<sup>1a\*</sup>,  Ana María Acevedo Beiras<sup>1a</sup>,  Cristian Díaz-Corona<sup>1</sup>,  
 Yalainne Obret Ferrer<sup>1</sup>,  Liuber Yans Machado Zaldívar<sup>2</sup>,  
 Pastor Alfonso Zamora<sup>1</sup>,  Nivian Montes de Oca Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),

Centro Colaborador de la OMSA para la Reducción de Riesgo de Desastres en Sanidad Animal,  
Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** La influenza aviar (IA) es una enfermedad viral altamente contagiosa con potencial zoonótico y graves consecuencias en la sanidad animal y la salud humana. Brotes de IA de alta patogenicidad (IAAP) causados por virus influenza A del subtipo H5N1 se han reportado en poblaciones de aves silvestres y domésticas en diferentes continentes. En septiembre de 2022, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) emitió una alerta para los países de América Central y América del Sur sobre el riesgo de introducción y propagación del virus de IAAP subtipo H5. Entre los meses de octubre y diciembre de 2022, el virus se propagó en varios países de esta región y aún se continúan reportando brotes de enfermedad. En Cuba no existen notificaciones previas de reportes de virus de IAAP en aves. En el presente estudio se describe la primera evidencia molecular del virus de IAAP infectando a una población de aves silvestres localizadas en el Jardín Zoológico de La Habana. El diagnóstico se realizó mediante ensayos de detección de ácidos nucleicos y su confirmación a través de la secuenciación de Sanger, con la consiguiente caracterización de la patogenicidad del virus actuante. Este estudio permitió detectar el virus de IAAP subtipo H5N1, por primera vez en Cuba, en especies de vida silvestre.

**Palabras clave:** aves silvestres, RT-PCR en tiempo real, secuenciación, virus de influenza aviar.

**ABSTRACT:** Avian influenza (AI) is a highly contagious viral disease with zoonotic potential with serious consequences for animal and human health. Outbreaks of highly pathogenic AI (HPAI) caused by influenza A viruses of the H5N1 subtype have been reported in wild and domestic bird populations on different continents. In September 2022, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) issued an alert for Central and South American countries regarding the risk of introduction and spread of the HPAI virus subtype H5. Between October and December 2022, the virus spread across several countries in this region, and disease outbreaks continue to be reported. No previous reports of HPAI virus in birds have been documented in Cuba. The present study describes the first molecular evidence of HPAI virus infecting a wild bird population located at the Havana Zoological Garden. Diagnosis was performed through nucleic acid detection assays and confirmed by Sanger sequencing, with subsequent characterization of the pathogenicity of the circulating virus. This study enabled the first detection of HPAI virus subtype H5N1 in Cuba in wildlife species.

**Keywords:** wildlife, real time RT-PCR, sequencing, avian influenza virus.

## INTRODUCCIÓN

La influenza aviar (IA) es una enfermedad viral altamente contagiosa con potencial zoonótico que representa una de las mayores preocupaciones para la industria avícola y la salud humana en todo el mundo (1). La alta propagación y recurrencia de brotes de IA de alta patogenicidad (IAAP) a nivel global en aves domésticas y silvestres representa una amenaza para todos los países. Desde la aparición de IAAP del subtipo H5N1 en el año 1996 en Asia, el virus se ha diversificado

significativamente en diversos subtipos y numerosos clados (2). A partir de 2020, una variante del virus perteneciente al clado H5 2.3.4.4b ha causado un número importante de muertes en aves silvestres y de corral en diversos países de África, Asia y Europa. En 2021, el virus se propagó a América del Norte, y en septiembre de 2022, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) emitió una alerta para los países de América Central y América del Sur sobre el riesgo de introducción y propagación del virus de IAAP subtipo H5 (3).

\*Correspondencia a: Carmen Laura Perera González. E-mail: [pereragonzalez@gmail.com](mailto:pereragonzalez@gmail.com)

<sup>a</sup>Autores en igualdad de condiciones

Recibido: 1/12/2025

Aceptado: 30/12/2025

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran no existen conflictos de intereses.

**Contribución de los autores:** Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Administración del proyecto, Revisión y edición: Carmen Laura Perera González. Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Redacción del borrador original, Revisión y edición: Ana María Acevedo Beiras. Curación de datos, Análisis Formal, Investigación: Cristian Díaz-Corona. Curación de datos, Análisis Formal, Investigación: Yalainne Obret Ferrer. Curación de datos, Análisis Formal, Investigación: Liuber Yans Machado Zaldívar. Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Revisión y edición: Pastor Alfonso Zamora. Curación de datos, Análisis Formal, Revisión y edición: Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el texto final.



En los años siguientes el virus se propagó en varios países de esta región. Entre los meses de octubre y diciembre de 2022, se detectó en Canadá, México, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, Honduras, Chile, Panamá, Perú, Venezuela y Bolivia. En 2023, varios países reportaron brotes, principalmente en las Américas, con varios eventos de muerte masiva en aves silvestres causados por virus de la cepa A (H5N1) clado 2.3.4.4b, y un número creciente de casos en mamíferos, tanto terrestres (incluso en animales de compañía), como acuáticos, causando morbilidad y mortalidad (4, 5, 6). En marzo de 2024 la IAPP se detectó por primera vez en cabras y en ganado lechero de los Estados Unidos (<https://www.USDA.gov>). Desde abril de 2024 hasta la fecha se han reportado casos de infección en humanos por virus de IA (H5N1) en diferentes estados, todos vinculados a brotes en aves y vacas lecheras ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

En Cuba no existen reportes de virus de IAAP en aves, a pesar del monitoreo activo generalizado que se realiza en aves domésticas y silvestres, como parte de la vigilancia activa de la enfermedad por parte del Centro Nacional de Salud Animal (CENASA), el servicio veterinario oficial del país, que a su vez reconoce a la Unidad de Diagnóstico de Virología Animal (UDVA), del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), como laboratorio de referencia nacional para el diagnóstico de enfermedades exóticas, emergentes y cuarentenadas. En la UDVA se ha trabajado en el desarrollo e incorporación de nuevas herramientas diagnósticas, como las recomendadas por los Laboratorios de Referencia de la OMSA, con el fin de responder e informar de forma rápida y efectiva ante los problemas zoonosarios que se presenten en el país.

El objetivo de este trabajo fue confirmar la sospecha clínica de IA mediante la detección del virus por ensayos

moleculares y la caracterización de la cepa circulante mediante la secuenciación de ácidos nucleicos.

## HISTORIA DEL CASO

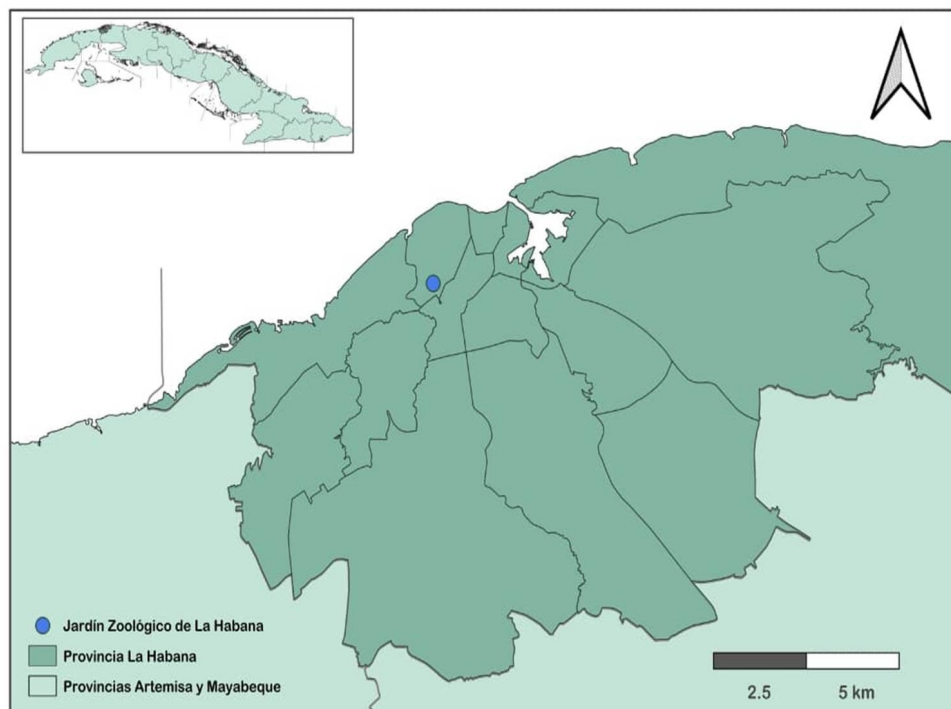
En el Jardín Zoológico de La Habana, en febrero de 2023 se presentó por primera vez en Cuba, un cuadro clínico-lesional compatible con IA en aves de vida silvestre de exposición. Al examen clínico los animales mostraban signos de inapetencia, incoordinación y muerte súbita, lo que dio lugar a la sospecha de la presencia de este agente.

El Jardín Zoológico se compone de tres zonas o áreas con la presencia de aves: el lago, la clínica y los aviarios. Solo en el área del lago se observaron aves afectadas (Figura 1), en tanto se procedió al sacrificio sanitario de toda población existente en esa área, la que se sometió a un proceso de desinfección. Se realizó monitoreo en las áreas no afectadas y se extremaron las medidas de bioseguridad. La población susceptible restante fuera del área del lago no se afectó.

De un total de 98 animales susceptibles, muestras de órganos y exudados de cuatro animales con signos clínicos compatibles con IA (M1-M4) fueron enviadas a la UDVA para realizar el diagnóstico virológico.

## Diagnóstico

Durante el trabajo con los animales y la toma de muestras se cumplieron los estándares internacionales de bienestar animal, establecidas en las normas para muestreo de animales del CENASA del Ministerio de Agricultura (MINAG) de la República de Cuba. Se emplearon los medios de protección para minimizar el riesgo de exposición del personal técnico.



**Figura 1.** Localización geográfica del lugar donde se constató influenza aviar altamente patógena en el Jardín Zoológico de La Habana, febrero de 2023 (latitud: 23.1108, longitud: -82.3972; localización aproximada). / Geographical location of the site where highly pathogenic avian influenza was confirmed at the Havana Zoological Garden, February 2023 (latitude: 23.1108, longitude: -82.3972; approximate location).

Debido al potencial zoonótico del virus de IA, el procesamiento de las muestras y la extracción del ARN genómico viral se realizó en un laboratorio de nivel de seguridad biológica 2, con las buenas prácticas de nivel 3. Como controles positivos se emplearon antígenos hemoaglutinantes inactivados del virus IA de los subtipos H5N1 y H7N1 que se emplean en el programa de vigilancia activa de la enfermedad en Cuba, y se incluyó el diagnóstico de Enfermedad de Newcastle, como parte del diagnóstico diferencial. Como control negativo de extracción se utilizó medio de cultivo (DMEM, Sigma) y agua libre de nucleasas (Promega) como control negativo de amplificación.

Las muestras de exudados (traqueales y cloacales) y de órganos (pulmón e intestino) de las cuatro aves con signos clínicos compatibles con IA se procesaron en la UDVA. Brevemente, las muestras de exudados se colocaron en PBS (pH 7.0-7.4), suplementado con 5 % de suero fetal bovino y antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomina y 20 µg/mL de fungizona) (Sigma Chemical Co <sup>TM</sup>, St. Louis, MO, E.U.A.). Las muestras se agitaron durante 30 s en un agitador de tubos y se centrifugaron durante 20 min a 1800 x g. Se colectó el sobrenadante y se conservó a 4°C para su utilización en los ensayos moleculares. Los órganos se homogenizaron a partir de un fragmento de aproximadamente 100 mg, que incluía parte del tejido dañado y sano, al cual se le añadió a 0,5 mL de medio DMEM (Gibco, E.U.A.), suplementado con 10.000 UI/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomina y 20 µg/mL de fungizona (Sigma Chemical Co <sup>TM</sup>, St. Louis, MO, E.U.A.). El tejido se homogenizó en un equipo Magna Lyser (Roche Applied Science) durante 30s a 5000 x g. Después de la centrifugación (9500 x g durante 1 min), se añadió 1 mL de medio adicional. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 9500 x g durante 5 min, se colectó el sobrenadante y se conservó a -80° C hasta su utilización.

El ARN del control positivo y de las muestras obtenidas de los animales se extrajo a partir de estuches comerciales. En el caso de los exudados se empleó el estuche comercial QIAamp<sup>®</sup> Mini kit (Qiagen<sup>®</sup>, GmbH, Hilden, Alemania) y para los órganos el RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones de los proveedores. El ADNc se sintetizó con cebadores aleatorios y con el empleo de la reverso transcriptasa M-MLV (Promega, Madison, WI, E.U.A) en un volumen final de reacción de 20 µL.

Para la detección del virus de IA se emplearon dos grupos de ensayos:

I. los ensayos de RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) con los cebadores recomendados por la OMSA, según los protocolos establecidos por la UDVA del CENSA a) Influenza A: Spackman *et al.* (7); b) Subtipo H5: Pérez *et al.* (8) con cebadores de Lee *et al.* (9); c) Subtipo H7: Slomka *et al.* (10), y II. los nuevos ensayos de rRT-PCR, con cebadores recomendados por la OMSA para detectar los virus del linaje H5 euroasiático del grupo Guangdong, diversificado y extendido a otros continentes en múltiples clados d) Influenza A: Nagy *et al.* (11) y e) Subtipo N1: Hassan *et al.* (12).

Todos los protocolos fueron adaptados al formato basado en SYBR Green y las corridas se realizaron en un instrumento LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

### I. a) rRT-PCR para detección de Influenza A

Para la detección de Influenza A se realizó el ensayo de rRT-PCR descrito por Spackman *et al.* (7). Brevemente: se emplearon los cebadores M+25: 5'-AGATGA GTCTTCTAACCGAGGTCG-3' y M-124: 5'-TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG-3' que amplifican un segmento de 99 pb del gen M. La mezcla de PCR contenía 0.8 µL de cada cebador sentido y antisentido, (concentración final de cada uno 0.4 µM), 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (10x), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 2 mM), 9.8 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del ADNc para un volumen final de 20 µL.

### I. b) rRT-PCR para detección de subtipo H5 de IA

Para la detección del subtipo H5 del virus de IA se realizó el ensayo de rRT-PCR descrito por Pérez *et al.* (8), con cebadores de Lee *et al.* (9). Brevemente: se emplearon los cebadores H5155f: 5'-ACACATGCYCARGACATACT-3' y H5699r: 5'-CTYTGRTTYAGTGTGATGT-3' que amplifican un segmento de 545 pb del gen H5. La mezcla de PCR contenía 0.8 µL de cada cebador sentido y antisentido, (concentración final de cada uno 0.4 µM), 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (10x), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 2 mM), 9.8 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del ADNc para un volumen final de 20 µL.

### I. c) rRT-PCR en tiempo real para la detección del subtipo H7 de IA

Para la detección del subtipo H7 del virus de IA se realizó el ensayo de rRT-PCR descrito por Slomka *et al.* (10). Brevemente, se emplearon los cebadores GK7.3 5'-ATGTCCGAGATATGT TAAGCA-3' y GK 7.4 5'-TTTGTAATCTGCAGCAGTTC-3' que amplifican un segmento de 220 pb del gen H7. La mezcla de PCR contenía 0.8 µL de cada cebador sentido y antisentido (concentración final de cada uno de 0.4 µM), 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (10x), 2.0 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 2.5 mM), 9.4 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del ADNc molde para un volumen final de 20 µL.

Todas las reacciones de rRT-PCR se realizaron por duplicado en el instrumento LightCycler 2.0<sup>®</sup> (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El termoperfil para todas las reacciones encaminadas a la detección del virus de influenza tipo A y su respectiva subtipificación en H5 y H7 fue el siguiente: 10 min. a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s, 55°C por 10 s y 72°C por 20 s. Con el objetivo de discriminar entre productos de amplificaciones específicas y no específicas, posterior a la etapa de amplificación, se generó una curva de disociación específica (0 s a 95°C, 15 s a 65°C, un tiempo de rampa de 20 °C/s y 0 s a 95°C con un tiempo de rampa de 0.1°C/s).

## II. d) rRT-PCR para detección de Influenza A

Para la detección de Influenza A se realizó el ensayo de rRT-PCR descrito por Nagy et al., (11). Brevemente: se emplearon los cebadores SVIP-MP-F 5'-GGCCCCCTCAAAGCCGA-3' y SVIP-MP-R 5'-CGTCTACGYTGCAGTCC-3' que amplifican un segmento de 182 pb del gen M. La mezcla de PCR contenía 1.2 µL de cada cebador sentido y antisentido (concentración final de cada uno de 0.6 µM), 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (10x), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 3.0 mM), 9.0 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del ADNc molde para un volumen final de 20 µL.

Todas las reacciones de rRT-PCR se realizaron por duplicado en el instrumento LightCycler 2.0® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El termoperfil fue el siguiente: 10 min. a 95°C, seguido por 45 ciclos a 95°C por 10 s, 60°C por 5 s y 72°C por 7 s. Con el objetivo de discriminar entre productos de amplificaciones específicas y no específicas posterior a la etapa de amplificación se generó una curva de disociación específica (0 s a 95°C, 15 s a 65°C, un tiempo de rampa de 20 °C/s y 0 s a 95°C con un tiempo de rampa de 0.1°C/s).

## II. e) rRT-PCR para detección del subtipo N1 de IA

Para la detección del subtipo N1 de IA se realizó el ensayo de rRT-PCR descrito por Hassan et al. (12). Brevemente, se emplearon los cebadores N1F: 5'-GRCCTTGYYTCTGGGTKGA-3' y N1R: 5'-ACCGTCTGGCCAAGACCA-3' que amplifican un segmento de 125 pb del gen N. La mezcla de PCR contenía 1.2 µL de cada cebador sentido y antisentido (concentración final de cada uno de 0.6 µM), 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (10x), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 2.5 mM), 9.0 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del ADNc molde para un volumen final de 20 µL.

Todas las reacciones de rRT-PCR se realizaron por duplicado en el instrumento LightCycler 2.0® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El termoperfil fue el siguiente: 10 min. a 95°C, seguido por 45 ciclos a 95°C por 10 s, 55°C por 5 s y 72°C por 5 s. Con el objetivo de discriminar entre productos de amplificaciones específicas y no específicas, posterior a la etapa de amplificación, se generó una curva de disociación específica (0 s a 95°C, 15 s a 60°C, un tiempo de rampa de 20 °C/s y 0 s a 95°C con un tiempo de rampa de 0.1°C/s).

### rRT-PCR basado en SYBR Green I para detección de paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), virus de la enfermedad de Newcastle

La detección del genoma del virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) se realizó mediante un ensayo de rRT-PCR en un solo paso, de acuerdo con el procedimiento realizado por el laboratorio de Referencia de la OMSA (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italia y National Reference Laboratory for Newcastle Disease and Avian Influenza, OMSA). Los cebadores utilizados fueron previamente descritos por Wise et al. (13) (APMV1F: 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3' y APMV1R: 5'-

CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'). El ensayo se realizó usando el Kit comercial LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La mezcla de reacción contenía 2 µL de cada cebador APMV1R / APMV1F (concentración final 4µM), 2 µL de Fast Start DNA Master SYBR Green I, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 3 mM), 7.8 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ADNc molde para un volumen final de 20 µL.

Todas las reacciones de rRT-PCR fueron realizadas en un termociclador Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Fue usado el siguiente protocolo: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s 60°C por 5 s y 72°C por 6 s. Después de los ciclos de PCR, una curva melting fue generada (0 s a 95°C, 15 s a 65 °C, con un tiempo de rampa de 20 °C/s y 0 s a 95°C con un tiempo de rampa de 0.4 °C/s) para discriminar entre amplicones específicos y productos de amplificación no específicos.

### Determinación de la patogenicidad. One Step RT-PCR para detección del subtipo H5 del virus de IA, descrito por Slomka et al. (10)

La reacción del PCR se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía 5 µL de 1x One step Qiagen RT-PCR Buffer (Promega, E.U.A), 10mM dNTP (concentración final 0.4 mM) (Promega, E.U.A), 0,5 µL de cada cebador H5-kha-1 y H5-kha-3 (concentración final 1µM), 0,2 µL de RNase Inhibitor (40U/µL (concentración final 8U), 1µL de Qiagen One step RT PCR Enzyme mix, 5 µL de Solución Q y 9.3 µL de agua libre de nucleasas (Promega, E.U.A). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler, Alemania), la mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 30 min, 95°C 15 min seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 58°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s. La extensión final se realizó a 72°C por 10 min.

Los productos del PCR se aplicaron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, E.U.A) al 2% en tampón TBE 0,5X pH 8.4 (89 mM de Tris; 89 mM de Ácido Bórico; 2 mM de EDTA), se corrieron a 100 Volts y 60 mA en una cámara de electroforesis Maxiphor 2012 (LKB, Bromma, Suecia), durante 35 min. Los geles se tñieron con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 15 min y los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Macro Vue (Pharmacia Biotech Inc., E.U.A). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, E.U.A).

### Secuenciación de Sanger del sitio de corte de la hemaglutinina

Los productos de la PCR amplificados del sitio de corte de la hemaglutinina se purificaron mediante el estuche QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Alemania) para su posterior empleo en la secuenciación nucleotídica. Las secuencias se obtuvieron mediante la química del estuche GenomeLab™ DTCS Quickstar kit (Beckman Coulter, E.U.A) en un analizador genético CEQ™ 8800 (Beckman Coulter, USA) y se ensamblaron mediante el programa Sequencher versión 5.0 (GeneCodes, Inc, Ann Arbor, Michigan, E.U.A).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las evidencias crecientes de perpetuación de los virus de IAAP en aves silvestres migratorias (14), auguran una mayor ocurrencia de brotes, dada la capacidad de diseminación entre países conectados por las rutas de aves migratorias. Cuba, no solo es un área trascendental de invernada para las aves migratorias de América del Norte, sino también un área de escala muy importante para las aves que se trasladan a otras islas del Caribe o las aves que migran más al sur (15). A estos riesgos se suma la existencia de abundantes poblaciones avícolas, tanto comerciales como de traspatio, con variable nivel de bioseguridad, condiciones que favorecen la introducción del virus de IAAP.

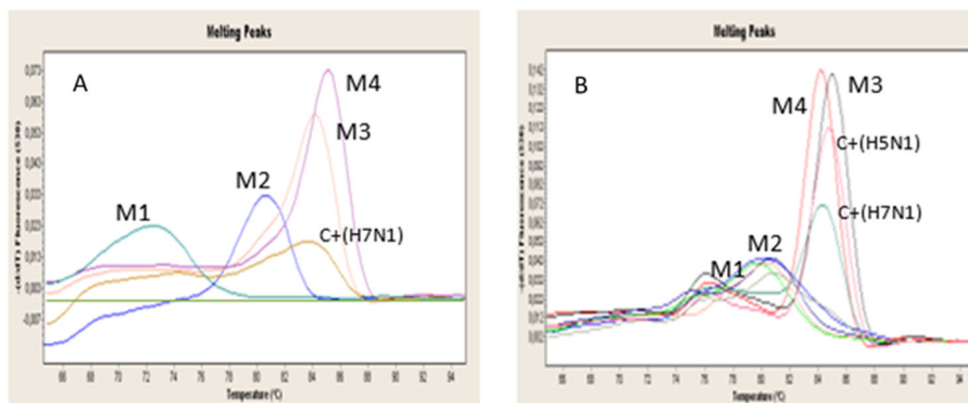
La presentación del brote de enfermedad respiratoria en el Jardín Zoológico de La Habana en febrero del 2023, con clínica compatible con IA, motivó la alerta temprana ante la posible presencia del virus en el país. Al analizar los resultados obtenidos mediante el ensayo de rRT-PCR para la detección de IA se demostró la presencia del virus en las muestras evaluadas en dos de las cuatro aves silvestres investigadas, las que resultaron positivas a IA tipo A.

Las muestras M3 y M4 (muestras de campo) mostraron curvas de amplificación específica para IA tipo A por el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green I, con los cebadores descritos por Spackman *et al.* (7), con una temperatura melting (Tm) específica de 84-85°C y por el ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green I con los cebadores descritos por Nagy *et al.* (11), con una Tm específica de 85°C (Figura 2). Estos resultados demuestran la presencia del virus de IA tipo A en las muestras M3 y M4.

Para descartar la presencia de los subtipos H5 y H7 de IAAP se evaluaron los protocolos de Pérez *et al.* (8) con cebadores de Lee *et al.* (9) y el protocolo de Slomka *et al.* (10), respectivamente. Con el ensayo de rRT-PCR para el subtipo H5, las muestras M3 y M4 resultaron positivas, con curvas de disociación específica similar a la del control positivo del ensayo, lo que demuestra que en ambas muestras se detectó la presencia del virus de IA. No se obtuvieron amplificaciones específicas para el subtipo H7 en las muestras evaluadas. Para la determinación del subtipo de neuraminidasa, se empleó el protocolo descrito por Hassan *et al.* (12). Las muestras M3 y M4 mostraron curvas de amplificación específica para la neuroaminidasa del subtipo N1, con una Tm específica de 81°C. Estos resultados demuestran la presencia del virus H5N1 en las muestras M3 y M4. En la Tabla 1 se reportan los valores de la Tm específica para los subtipos H5 y H7 de las hemaglutininas y el subtipo N1 de la neuraminidasa.

Con el empleo de estos protocolos de diagnóstico se confirmó la presencia del virus de IA subtipo H5N1, con la consiguiente notificación a la OMSA sobre la presencia de este subtipo de alta patogenicidad en aves silvestres.

La identificación de los virus de influenza A como causa de infecciones y enfermedades en las aves de corral y otras aves requiere un proceso de diagnóstico exhaustivo para su diferenciación con enfermedades similares causadas por otros agentes víricos, especialmente paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1). Las cepas de virus influenza A y APMV-1 varían mucho en virulencia, y causan varios síndromes que se evidencian como infecciones subclínicas, con disminución en la producción de huevos,



**Figura 2.** Curvas de disociación de muestras evaluadas para la detección de influenza tipo A por el ensayo de RT-PCR en tiempo real basado en SYBR Green I de A: Spackman *et al.*, 2002 y B: Nagy *et al.*, 2021. / Dissociation curves of samples evaluated for influenza type A detection by SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay according to A: Spackman *et al.*, 2002 and B: Nagy *et al.*, 2021.

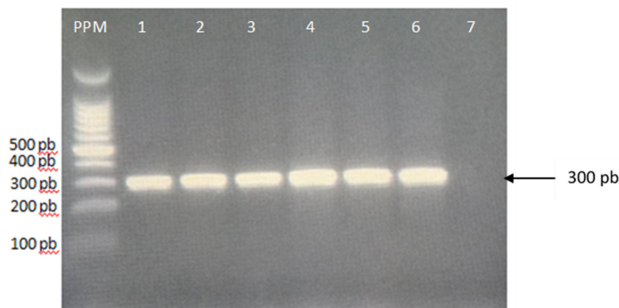
**Tabla 1.** Valores de Tm específica para los subtipos de hemaglutininas H5 y H7, el subtipo N1 de la neuraminidasa de IA y el APMV-1 de la enfermedad de Newcastle. / Specific Tm values for H5 and H7 hemagglutinin subtypes, the N1 neuraminidase subtype of AI, and APMV-1 of Newcastle disease.

Identificación	Subtipificación H y N			APMV-1 (Matriz)
	H5 (Tm)	H7 (Tm)	N1 (Tm)	
M1	84,21	-	82,42	-
M2	85,26	-	82,77	-
M3	-	-	-	-
M4	-	-	-	-
H5N1	84,17	-	82,87	-
H7N1	-	80,39	82,60	-
NCV	-	-	-	85,31

enfermedad respiratoria y también como enfermedad grave con alta mortalidad. Este último síndrome clínico puede estar causado por virus de IAAP o por virus de la enfermedad de Newcastle. Por lo tanto, consideramos prudente aplicar un solo procedimiento de muestreo y realizar simultáneamente pruebas de diagnóstico de diferenciación específicas para los virus de influenza A y del APMV-1 con el fin de obtener un diagnóstico etiológico preciso, si estaba presente un solo agente viral o si se trataba de una infección dual.

Los resultados negativos del rRT-PCR para el APMV-1 confirmaron su ausencia en todas las muestras evaluadas (Tabla 1).

Para conocer el patotipo de las dos muestras que resultaron positivas al subtipo H5 de IA, se amplificó el sitio de corte de la hemaglutinina mediante el ensayo OneStep RT-PCR de Qiagen. En la Figura 3 se muestran los fragmentos amplificados de 300 pb, para cada una de las muestras y el control positivo.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa (2 %) del RT-PCR en un solo paso para detección del subtipo H5 en el sitio de corte de la hemaglutinina. Línea PPM: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega, E.U.A.); Línea 1: muestra M-3; Línea 2: muestra M-3; Línea 3: muestra M-3; Línea 4: muestra M4; Línea 5: muestra M-4; Línea 6: Control positivo; Línea 7: Control negativo (agua libre de nucleasas). / *Agarose gel electrophoresis (2 %) of one-step RT-PCR for H5 subtype detection at the hemagglutinin cleavage site. Lane PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega, USA); Lane 1: sample M-3; Lane 2: sample M-3; Lane 3: sample M-3; Lane 4: sample M-4; Lane 5: sample M-4; Lane 6: positive control; Lane 7: negative control (nuclease-free water).*

El análisis de la secuencia traducida del gen de la hemoaglutinina (HA) reveló la presencia de múltiples aminoácidos básicos PQGERRRKKRGLF y PQRERRRKKRGLF, en el sitio de corte de la hemoaglutinina, lo que confirma la presencia de un virus de influenza aviar de alta patogenicidad perteneciente al clado 2.2 (A/turkey/Turkey/1/05 y otros virus H5N1 del Clado 2.2).

La vía de introducción del virus de IAAP subtipo H5N1 al país no está clara aún, aunque se conoce que en Cuba cada año, entre los meses de agosto y abril, penetran cientos de miles de individuos de más de 200 especies de aves que proceden del norte y sur de América, Europa, Asia, Islas Vírgenes, Groenlandia, el Ártico y otras regiones del planeta (16). De acuerdo con el patrón estacional histórico de la IAAP, la propagación es más baja en el mes de septiembre, comienza a aumentar en octubre, y alcanza su punto máximo en febrero, mes en el que ocurre el brote de IAAP en el Jardín Zoológico de La Habana. Se sugiere que la fuente de origen de la infección haya sido el contacto de las aves

de exposición con especies de aves silvestres, por lo que la posible introducción del subtipo H5N1 en el país pudiera estar relacionado con el tránsito de las aves migratorias por el territorio nacional.

Los virus que causan la influenza A tienen potencial de propagación si no existen niveles suficientes de bioseguridad y bioprotección, por lo que en este evento se aplicaron las medidas apropiadas, como se describe en el Capítulo 3.3.4. del Manual de la OMSA, Anexo 3.3.4.1 relacionado con las directrices relativas a la bioprotección durante la manipulación de virus de IAAP (17). Las medidas tomadas permitieron contener el brote en la instalación del zoológico, y no se detectó ningún caso de infección en el personal que manipuló los animales, ni en el personal del laboratorio.

Los resultados de este trabajo demuestran la importancia de que los laboratorios de diagnóstico cuenten con las estrategias y metodologías más actualizadas que permitan el diagnóstico confirmativo rápido y seguro, pues la alerta temprana posibilita que los servicios veterinarios puedan tomar medidas rápidas y eficaces con el fin de frenar o impedir la propagación de una enfermedad grave, como la IAAP, en una zona o en el país, teniendo en cuenta las consecuencias devastadoras que trae consigo para la economía y la seguridad alimentaria, así como para la salud pública en el caso de las zoonosis.

Se recomienda que los países mantengan y refuercen sus sistemas de vigilancia para la alerta temprana y las medidas de bioseguridad en las granjas, además de garantizar la notificación oportuna de brotes de influenza aviar, tanto en aves domésticas como silvestres. La calidad de la vigilancia es clave para la detección temprana y la respuesta oportuna ante amenazas potenciales para la salud animal con impacto en la salud pública humana (6, 18, 19).

## CONCLUSIONES

Se detectó y caracterizó molecularmente el virus de IAAP subtipo H5N1 en especies de vida silvestre en exposición, lo que constituye la primera evidencia de circulación de este virus en Cuba.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dr.C. Damarys de las Nieves Montano del grupo de Clínica y Epidemiología del CENSA por su contribución en la elaboración de la Figura 1.

## REFERENCIAS

1. Swayne D E, Sims L, Brown I, Harder T, *et al.* (2023). Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza. Technical Item in 90th General Session World Organisation for Animal Health, World Assembly, available in <https://www.woah.org/app/uploads/2023/05/a-90sg-8.pdf>.
2. World Health Organisation. H5N1 avian influenza: timeline of major events. See: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/ai\\_timeline/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html). Accessed on 12 June 2009.
3. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (13 de septiembre de 2022). FAO alert for central america and south america: H5 high pathogenicity avian influenza - risk

- for Introduction and spread. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cc1998en/cc1998en.pdf>.
4. Organización Mundial de Sanidad Animal. Influenza Aviar. París: OMSA; 2024 [citado el 18 marzo del 2024]. Disponible en: <https://www.woah.org/es/enfermedad/influenza-aviar> y <https://wahis.woah.org/#/event-management>.
  5. Organización Mundial de Sanidad Animal High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) - Situation Report 50. 31 de octubre del 2023. París: OMSA; 2023. Disponible en inglés en: <https://www.woah.org/es/documento/high-pathogenicity-avian-influenza-hpai-situationreport-50/>.
  6. Organización Mundial de la Salud. Ongoing outbreaks of avian influenza in animals pose risk to humans. 12 de julio del 2023. Geneva: OMS; 2023. Disponible en inglés en: <https://www.who.int/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans>.
  7. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002;40:3256-60.
  8. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Cilloni F, Salviato A, Marciano S, Perera CL, et al. A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus. *Mol Cell Probes*. 2012; 26:137-45.
  9. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J VirolMeth* 2001;97:13e22.
  10. Slomka MJ, Coward VJ, Banks J, Londr BZ, Brown IH, Voermans J, et al. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. *Avian Dis* 2007;51:227e34.
  11. Nagy A, Cermíková L, Kunteova K, Dirba'kova Z', Thomas S, Marek J, Slomka ID, Da'n A, Varga T, Ma'te M, Jiřincova H, Brown IH, A universal RT-qPCR assay for "One Health" detection of influenza A viruses. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244669>. 2021; 20: 1-18.
  12. Hassan KE. HA and NA subtyping of avian influenza virus by real-time RT-PCR. SOP VIR 1004. Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe); 2022. Released 2023-09-28.
  13. Wise M, Suárez DL, Seal BS. Development of real-time reverse transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol* 2004;42 (1): 329-338.
  14. Lycett SJ, Pohlmann A, Staubach C, Caliendo V, Woolhouse M, Beer M, et al. Genesis and spread of multiple reassortants during the 2016/2017 H5 avian influenza epidemic in Eurasia. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117(34):20814-25.
  15. Aguilar S, Manica LT, Acosta M, Castro R, Hernández Z, González A, et al. Spatio-temporal patterns of waterbird assemblages in Cuba's south coast wetlands: conservation implications. *Wetlands*. 2019;1-13.
  16. Cosme Casals Corella, José E. Corella Varona (Centro Provincial de Patrimonio Cultural, Municipio Gibara. Sociedad Espeleológica de Cuba). Un viaje a través de nuestro litoral. Potencial natural de Gibara, Holguín. Trabajo Inédito. EcuRed. 18-22 de marzo 2022 "Corredor Migratorio de Aves de Gibara". (<https://www.informaticahabana.cu>).
  17. Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal. 2021. Capítulo 3.3.4. Influenza aviar (Incluida la infección por los virus de la influenza aviar altamente patógenos). Anexo 3.3.4.1. Directrices relativas a la bioprotección durante la manipulación de virus de IAAP en laboratorios de diagnóstico veterinarios. pp28-29.
  18. Organización Mundial de Sanidad Animal. Influenza Aviar. París: OMSA; 2023 [citado el 3 agosto 2023]. Disponible en: <https://www.woah.org/es/enfermedad/influenza-aviar/> y <https://wahis.woah.org/#/event-management>.
  19. Organización Mundial de Sanidad Animal. Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) - Informe de situación 46. 21 de julio 2023. París: OMSA; 2023. Disponible en: <https://www.woah.org/es/documento/high-pathogenicity-avian-influenza-hpai-situationreport-46/>.